S 11/10

CHARAKTERISIERUNG UND ROSETTENSEPARATION VON T-LYMPHOZYTEN MIT POLYKLONALEM ANTITHYMOZYTENGLOBULIN (ATG) UND MONOKLONALEM PAN-T-ANTIKÖRPER IM KNOCHENMARK ZUR PROPHYLAXE DER GRAFT-VERSUS-HOST KRANKHEIT BEIM HUND

Disbui. München
1988

JULIANE MALDACKER

1987

HARVARD UNIV.
LIBRARY
THE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555421_0047

Aus dem Institut für Immunologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg
(Leiter Prof. Dr. S. Thierfelder)

vorgelegt über Prof. Dr. K. Tempel

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Leiter Prof. Dr. R. Schulz)

Charakterisierung und Rosettenseparation von T-Lymphozyten mit polyklonalem Antithymozytenglobulin (ATG) und monoklonalem Pan-T-Antikörper im Knochenmark zur Prophylaxe der Graft-versus-Host Krankheit beim Hund

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Juliane Maldacker
aus
Lauterbach

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. K. Tempel
Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 26.Februar 1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Schrifttum	7
Abkürzungsverzeichnis	15
Material und Methoden	16
1. Zellkulturmedien	16
2. Gerinnungshemmer	17
3. Reagentien	17
4. Dichtegradientenmedien	17
5. Blut und Knochenmark	17
6. Schaferythrozyten, Rindererythrozyten	18
7. Antikörper und Antiseren	18
Methoden	19
1. Waschvorgänge	19
2. Beschichtung von Schaferythrozyten mit Staphylokokkenprotein A	19
3. Herstellung eines Percoll-Gradienten	19
4. Rosettierung	20
5. Dichtegradientenzentrifugation zur Rosettenseparation	21
6. Immunfluoreszenz mit PLL-beschichteten Objektträgern	21
a) Präparation der Objektträger	21
b) Durchführung	22
7. CFU_{GM}-Kultur	22
8. Separation über Nylon-Wolle	23
9. Separation des Knochenmarks zur Transplantation	23
a) Gewinnung des Buffy Coats	23
b) Ficoll-Separation	23
c) Inkubation mit MoAk 9G5	24
d) Inkubation mit SPA-SRBC	24
e) Separation über Percoll	24

10. Transplantation 25

Ergebnisse 26

A) Erkennung von T-Lymphozyten mit absorbiertem ATG und monoklonalem Antikörper 9G5 26

1. Reaktivität des Antiserums ATG 1202 und des monoklonalen Antikörpers 9G5 in Rosettierung und Immunfluoreszenz 26

1.1. Rosettierung in Blut und Knochenmark erwachsener Hunde 26
1.2. Immunfluoreszenz in Blut und Knochenmark erwachsener Hunde 27
1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse 27

2. Charakterisierung des ATG 1202 und des MoAk 9G5 33
2.1. Vergleich von Organen mit unterschiedlichem T-Zell-Gehalt 34
2.1.1. Rosettierung 34
a) Milz 35
b) Thymus 35
c) Knochenmark 35
2.1.2. Immunfluoreszenz 36
a) Milz 36
b) Thymus 36
c) Knochenmark 36
2.2. Vergleich von Zellsuspensionen mit unterschiedlichem T-Zellgehalt, die durch Separation über Nylon-Wolle gewonnen wurden 37
2.2.1. Rosettierung 37
2.2.2. Immunfluoreszenz 40
2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse 40

3. Immunfluoreszenz/Doppelfluoreszenz 41

B) Separation der rosettierten Zellsuspension über Percoll 43

1. Separation ATG 1202-rosettierter Knochenmarkzellen 43
1.1. Untersuchungen über der Einfluß der Separationsbedingungen auf die Rosettendepletion 44
1.1.1. Ermittlung der benötigten Percoll-Dichte 44
1.1.2. Ermittlung der besten Zentrifugationszeit und Zentrifugationsgeschwindigkeit 47
1.1.3. Nachweis der CFU_{GM} nach Separation mononukleärer Knochenmarkzellen über Percoll der Dichte 1,085 g/ml 49
1.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse 49

2. Rosettierung mit Rindererythrozyten 50

3. Untersuchungen über den Einfluß von Waschmedium und Vorinkubation auf die Rosettenbildung und -separation 51
3.1. Waschmedium 52
3.1.1. Hanks ohne BSA als Waschmedium 52
3.1.2. Ca/Mg-freies Hanks als Waschmedium 53
3.1.3. Hanks mit 20% autologem Serum als Waschmedium 53
3.2. Vorinkubation 54
3.2.1. Vorinkubation in Hanks 54
3.2.2. Vorinkubation in autologem Serum 55
3.2.3. Vorinkubation in FCS 55
3.2.4. Vorinkubation in IgG-freiem FCS 55
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse 57

4. Separation ATG 1202-rosettierter Blutzellen 58

5. Separation MoAk 9G5-rosettierter Knochenmarkzellen 59
5.1. Rosettierung größerer Zellmengen 59
5.1.1. Verlängerung der Inkubationszeit 59
5.1.2. Rosettierung mit Zweitantikörper 60

5.1.3. Rosettierung mit mehrmaligem Aufschütteln während der Inkubation 63
5.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse 66
6. Zellausbeute in der Interphase nach Percoll-Separation rosettierter Knochenmarkzellen 66

7. Nachweis der CFU_{GM} nach Separation rosettierter Knochenmarkzellen 67

C) Transplantation und Vorversuche zur Transplantation 69

1. Vorversuche zur Transplantation 69
1.1. Einfluß der Zellkonzentration und der Antikörperkonzentration auf die Rosettenbildung 70
1.2. Einfluß der Erythrozytenkonzentration auf die Rosettenbildung 71

2. Transplantation 74
2.1. Zellverlust bei aufeinanderfolgenden Separationsschritten 75
2.2. Rosettierung und Separation der Transplantate 77
2.3. Immunfluoreszenz mit MoAk 9G5 79
2.4. Klinischer Verlauf nach Transplantation 81

Diskussion 86

Zusammenfassung 97

Summary 98

Literatur 99

Lebenslauf 120

Einleitung

Die schädigende Wirkung ionisierender Strahlen auf die Blutbildung ist schon seit der Jahrhundertwende bekannt (Heinecke 1903). Nach Ganzkörperbestrahlung kommt es zur Zerstörung der Hämopoese (Knochenmarksyndrom). Egon Lorenz (1951) konnte bei der Maus zeigen, daß die Injektion von Knochenmark nach der Bestrahlung den Strahlentod verhindern kann. Allerdings konnte es nach Erholung der Hämopoese zu einer zweiten Krankheit kommen, die durch eine Reaktion des Transplantates gegen den Empfänger (Graft-versus-Host Reaktion) verursacht wurde.

Mittlerweile wird die Ganzkörperbestrahlung mit nachfolgender Knochenmarktransplantation zur Behandlung von Leukämie und anderen malignen Erkrankungen des hämopoetischen Systems eingesetzt, wobei die Graft-versus-Host Reaktion weiterhin therapeutische Probleme bietet. Sie zerstört die Haut, die Schleimhäute des Darmes und die Leber und geht mit einer besonderen Infektionsanfälligkeit einher. Da die Graft-versus-Host Krankheit besonders schwer verläuft, wenn Empfänger und Spender sich in Antigenen des Haupthistokompatibilitätskomplexes unterscheiden, ist die Möglichkeit einer Behandlung durch Knochenmarktransplantation im allgemeinen auf Patienten mit HLA-identischen Geschwistern beschränkt. Dennoch kann auch bei HLA-Identität von Spender und Empfänger unbeherrschbare Graft-versus-Host Krankheit auftreten (Bortin et al. 1987).

Die Graft-versus-Host Reaktion wird durch immunkompetente Zellen des Transplantates hervorgerufen, die gegen den immungenetisch fremden und immuninkompetenten Empfänger reagieren (Simonsen 1967). Immunologisch unreife Transplantate, wie z. B. foetale Leberzellen, besitzen eine geringe (Uphoff 1958), Transplantate mit hohem Anteil immunologisch kompetenter Zellen, wie z. B. Milz, eine hohe Graft-versus-Host Aktivität (Warner et al. 1962). Daher wurde vielfach versucht, den Anteil immunkompetenter Zellen, vor allem T-Lymphozyten, im Knochenmark vor der Transplantation zu

verringern.
Die Inaktivierung von T-Lymphozyten im Knochenmark ist mit physikalischen, chemischen und immunologischen Methoden möglich . Besonders erfolgreich war die Behandlung des Knochenmarks in vitro mit absorbiertem Antithymozytenglobulin bei Maus (Thierfelder et al. 1972) und Hund (Kolb et al. 1979). Selbst bei DLA-inkompatiblen Empfängern konnte die Inkubation mit absorbiertem Antithymozytenglobulin eine akute Graft-versus-Host Krankheit in den meisten Fällen verhindern (Kolb et al. 1979). Transplantate von DLA-haploidentischen Spendern wurden jedoch häufig abgestoßen. Die Abstoßung konnte durch die Inaktivierung von hämopoetischen Stammzellen durch kreuzreagierende Antikörper des Antithymozytenglobulins oder durch das Fehlen von T-Lymphozyten im Transplantat, die für das Anwachsen des Transplantates notwendig sind, bedingt sein. Es stellte sich die Frage, wieviele T-Zellen im Transplantat inaktiviert werden mußten, um eine tödliche Graft-versus-Host Krankheit zu verhindern, ohne das Anwachsen des Transplantates zu gefährden. Bei Inkubation des Transplantates mit absorbiertem Antithymozytenglobulin war eine Bestimmung der verbliebenen funktionsfähigen T-Zellen nicht möglich, da der größte Teil der T-Zellen vermutlich erst im Empfänger einer Antithymozytenglobulin vermittelten Opsonisierung zum Opfer fiel.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit absorbiertem Antithymozytenglobulin und einem monoklonalen Antikörper T-Zellen im Knochenmark zu charakterisieren, mittels Rosettenbildung mit Protein A-beladenen Erythrozyten und Dichtegradientenzentrifugation vom Knochenmark abzutrennen und auf diese Weise depletiertes Knochenmark zur autologen und allogenen Transplantation zu verwenden. Die Versuche wurden am Hund durchgeführt, weil die Methoden der Spenderauswahl, die Technik der Knochenmarkgewinnung sowie der Separation und Transplantation und die Untersuchungsmethoden im Verlauf denen des Menschen vergleichbar sind.

Schrifttum

Schon 1916 beobachtete Murphy eine Milzvergrößerung bei Hühnerembryonen nach Implantation von Milz erwachsener Hühner auf die Chorionallantoismembran. Über 40 Jahre später konnte Simonsen (1957) ähnliche Veränderungen durch die Injektion von Blutleukozyten hervorrufen. Mehrere Untersucher zeigten daraufhin, daß Lymphozyten für diese Veränderungen verantwortlich waren (Terasaki 1959, Szenberg et al. 1961, Billingham et al. 1959, Hildemann et al. 1962, Andersen et al. 1966, Gowans 1962). Die beschriebenen Veränderungen waren nur hervorzurufen, wenn die transferierten Zellen immunkompetent, der Empfänger der Zellen jedoch immuninkompetent war. Somit war eine Graft-versus-Host Reaktion (Transplantat gegen Wirt Reaktion) als Ursache wahrscheinlich (Simonsen 1957, Cock et al. 1958). Die genetischen Grundlagen der Graft-versus-Host Reaktion wurden dann an Mäusen geklärt, von denen zu diesem Zeitpunkt schon Inzuchtstämme zur Verfügung standen (Simonsen 1957, Billingham et al. 1959). Billingham et al. (1953) fanden, daß neugeborene Mäuse immunologisch unreif waren und gegen fremde Transplantate tolerant wurden. Nach Injektion immunologisch kompetenter Zellen entwickelten die Mäuse ein "runt disease". Bei letal bestrahlten Tieren sahen Barnes et al. (1956) nach Transplantation von Knochenmark ähnliche Krankheitssymptome. Sie nannten die Krankheit jedocn "secondary disease", um sie vom Strahlensyndrom abzugrenzen. Schließlich beschrieben Nowell et al. (1959), sowie Vos et al. (1959) eine ähnliche Symptomatik als "homologous disease", das nach Transplantation von parentalen Milz oder Lymphknotenzellen bei F_1-Hybriden auftrat, die gegen das Transplantat nicht reagieren konnten, da sie alle Antigene des Transplantates selbst besaßen. Die Gleichartigkeit der Veränderungen wurde von Van Bekkum et al. (1967) aufgezeigt und auf eine Graft-versus-Host Reaktion als gemeinsame Ursache zurückgeführt. Die Graft-versus-Host Reaktion wird vor allem durch T-Lympho-

zyten verursacht, da Zellen thymektomierter Tiere solche Veränderungen nicht hervorrufen konnten (Miller et al. 1962). Organe unbehandelter Tiere mit unterschiedlicnem T-Zell-Gehalt zeigten unterschiedliche Graft-versus-Host Aktivität (Owens et al. 1968, Warner et al. 1962).

Die charakteristischen Symptome der Graft-versus-Host Krankheit wurden von van Bekkum et al. 1967 bei mehreren Spezies beschrieben und von der Strahlenkrankheit abgegrenzt. Die akute Graft-versus-Host Krankheit tritt bereits früh nach Angehen des Transplantates auf und äussert sich in einer Entzündung der Haut, des Darmes und der Leber (van Bekkum et al. 1967). Schwere Graft-versus-Host Krankheit kann einen tödlichen Verlauf nehmen, wobei Infektionen eine große Rolle spielen. Bereits van Bekkum (1967) stellte der akuten Graft-versus-Host Krankheit, die bei der Maus durch Milzzellen hervorgerufen werden kann, eine chronische Graft-versus-Host Krankheit gegenüber, die bei der Maus durch Knochenmarkzellen verursacht wird. Chronische Graft-versus-Host Krankheit tritt verzögert nach Angenen des Transplantates auf und verläuft schleichend. Die typischen Veränderungen sind Gewichtsverlust, Aplasie der lymphatischen Organe und rezidivierende Infektionen (Shulman et al. 1978). Das klinische Bild chronischer Graft-versus-Host Krankheit ähnelt in vielen Symptomen dem von Autoimmunkrankheiten (Gleichmann et al. 1976). Beim Menschen wurden lichenoide und sklerodermieartige Veränderungen der Haut, Haarausfall, Trockenheit der Schleimhäute, Leberzirrhosen und rezidivierende Durchfälle beschrieben (Sullivan et al. 1981). Die Ähnlichkeit von chronischer Graft-versus-Host Krankheit und Autoimmunkrankheiten veranlaßte Gleichmann et al. (1976) zu der Vermutung, daß den Veränderungen in beiden Fällen eine fehlerhafte T-Zell-Regulation als gemeinsame Ursache zugrunde liegt.

Schwere, akute Graft-versus-Host Reaktionen werden nur beobachtet, wenn der Empfänger Antigene besitzt, die dem Transplantat fremd sind. Bei Transplantationen zwischen Mäusen verschiedener Inzuchtstämme konnten Antigene des "Major Histocompatibility Complex" (MHC) (Snell 1957) und

andere Antigene ("Minor Histocompatibility Antigens") als Ziele einer Graft-versus-Host Reaktion definiert werden (Korngold et al. 1978). Bei allen untersuchten Spezies wurden in einer chromosomalen Region die Gene des "Major Histocompatibility Complex" gefunden, die für Histokompatibilitätsantigene der Klasse I und II codieren (Snell 1957). Während Antigene der Klasse I vor allem zytotoxische Antikörper hervorrufen und gute Ziele zytotoxischer T-Zellen abgeben, zeichnen sich Determinanten der Klasse II durch ihre hohe Stimulationsfähigkeit allogener Lymphozyten aus. Bei der Maus führen Klasse II-Unterschiede des Empfängers zum Spender zu besonders ausgeprägter Milzvergrößerung (Klein et al. 1973), während Klasse I-Unterschiede besser mit der Mortalität infolge Graft-versus-Host Reaktion korrelieren. Auch "Minor Histocompatibility Antigens" können Ziele schwerer Graft-versus-Host Reaktionen sein (Graw et al. 1970, Korngold et al. 1978). Allerdings gibt es kaum Bestimmungsmethoden für "Minor Histocompatibility Antigens", da sie weder zytotoxische Antikörper hervorrufen, noch in Kurzzeitkulturen allogene T-Zellen stimulieren. Lediglich mit klonierten zytotoxischen T-Zellen aus dem Blut transplantierter Individuen lassen sich "Minor Histocompatibility Antigens" nachweisen (Goulmy et al. 1977). Der Nachweis wird dadurch erschwert, daß die Reaktion MHC-restringiert ist (Korngold et al. 1982), das heißt, daß Spender und Empfänger in einem bestimmten MHC-Produkt übereinstimmen müssen. Vermutlich spielen bei HLA-identisch transplantierten Patienten "Minor Histocompatibility Antigens" eine große Rolle, da Graft-versus-Host Reaktionen bei mehr als der Hälfte der Patienten auftreten und in 15 bis 40% sogar tödlich verlaufen (Bortin et al. 1987). Zur Prophylaxe der Graft-versus-Host Reaktion bestehen mehrere Möglichkeiten. Zunächst bietet die Auswahl weitgehend histokompatibler Spender die beste Möglichkeit zur Verhütung einer Graft-versus-Host Krankheit. Im Allgemeinen kommen heute nur HLA-identische Geschwister als Knochenmark-Spender in Betracht. Durch diese Beschränkung verfügt lediglich 1/5 der Patienten

über einen passenden Spender. Sollten Spender und Empfänger auch in "Minor Histocompatibility Antigens" übereinstimmen, würde der Kreis der Spender noch weiter verringert. Daher versuchten die meisten Untersucher, die immunsuppressiven Methoden zur Prophylaxe einer Graft-versus-Host Krankheit zu verbessern. Die immunsuppressive Vorbehandlung des Spenders mit Antilymphozytenglobulin war bei der Maus erfolgreich (Thierfelder et al. 1967), ist beim Menschen aber aus ethischen Gründen nicht anwendbar. Hämopoetische Transplantate von immunologisch unreifen Spendern, wie z. B. Foeten (Uphoff 1958, 1971), wurden gelegentlich zur Behandlung von Immundefekten verwendet. Die breiteste Anwendung fand bislang die prophylaktische immunsuppressive Behandlung des Empfängers nach der Transplantation. Hierbei hat sich unter anderem vor allem das Zytostatikum Methotrexat und das Immunsuppressivum Cyclosporin A bewährt. Methotrexat tötet die Zellen ab, die sich nach Antigenkontakt teilen; Cyclosporin A hemmt die Entstehung zytotoxischer T-Zellen und vermindert die Proliferation von T-Helferzellen.

Schließlich wurde versucht, mit physikalischen, chemischen oder immunologischen Methoden aus dem Knochenmark-Transplantat T-Zellen zu entfernen, die für die Graft-versus-Host Reaktion verantwortlich sind. Dicke et al. (1971) gelang es, durch Zentrifugation über Dichtegradienten hämopoetische Vorläuferzellen anzureichern. Eine Weiterentwicklung der physikalischen Methoden ist die Zellelutriation (de Witte et al. 1984, Noga et al. 1986, de Witte et al. 1986), die in der Lage ist, mehr als 95% der T-Zellen aus dem Knochenmark zu entfernen. Allerdings war die Entfernung von T-Zellen nicht in allen Fällen ausreichend, da ohne weitere immunsuppressive Therapie schwere Graft-versus-Host Reaktionen auftraten (de Witte et al. 1986).
Im Gegensatz zu chemischen Methoden der in vitro Behandlung des Knochenmarks (Tutschka et al. 1981) fanden immunologische Methoden breitere klinische Anwendung.

Die erste immunologische Methode der Behandlung des Knochenmark-Transplantates in vitro bestand in der Inkubation mit absorbiertem polyklonalem Antithymozytenglobulin (Rodt et al. 1972). Polyklonale Antiglobuline gegen Thymozyten müssen mehrfach absorbiert werden, um den Gehalt an kreuzreagierenden Antikörpern gegen hämopoetische Stammzellen zu reduzieren. Solche absorbierten Antithymozytenglobuline waren zur Prophylaxe der Graft-versus-Host Reaktion bei Maus (Rodt et al. 1972) und Hund (Kolb et al. 1979) erfolgreich und verminderten beim Patienten Häufigkeit und Ausprägung der Graft-versus-Host Krankheit (Rodt et al. 1977). Während die Graft-versus-Host Reaktion gegen Haupthistokompatibilitätsantigene durch Inkubation des Transplantates mit absorbiertem Antithymozytenglobulin unterdrückt werden konnte, war das Anwachsen von Transplantaten von MHC-inkompatiblen Spendern erschwert (Kolb et al. 1979). Als Ursache des erschwerten Anwachsens inkompatibler Transplantate konnte eine restliche Aktivität der verwendeten Antiglobuline gegen hämopoetische Stammzellen nicht ausgeschlossen werden.

Monoklonale Antikörper sind zur Erkennung von T-Zellen im Transplantat besser geeignet, da sie für ein Antigen spezifisch und in beliebiger Menge herstellbar sind. Allerdings fanden Thierfelder et al. (1985), daß die Mehrzahl monoklonaler Antikörper gegen T-Lymphozyten ohne Komplementzugabe nur eine unzureichende immunsuppressive Wirkung entfalteten. Zum einen sind die von den Antikörpern erkannten Antigene oft nur in geringer Dichte auf der Zelloberfläche vertreten, zum anderen ist ihre biologische Aktivität in der Ausschaltung von T-Zellen häufig zu gering. Nur 2 der von Thierfelder et al. (1986) getesteten Anti-Thyl-Antikörper waren in der Lage, autologes C1q zu binden. Durch die Aktivierung von Kaninchenkomplement entfalteten diese Antikörper ihre zytotoxische Wirkung in vitro. Zusätzlich führte die C1q-Bindung durch den monoklonalen Antikörper zu einer nachhaltigen Wirkung im Empfänger. Diese Fähigkeit war mit der Immunglobulinklasse (IgG 2b der Ratte oder IgG2a der Maus) korreliert.

Die Inkubation menschlicher Knochenmark-Transplantate mit monoklonalem OKT3-Antikörper ohne Komplementzugabe war nicht ausreichend immunsuppressiv (Prentice 1982). Prentice konnte die Entstehung akuter, tödlicher Graft-versus-Host Krankheit beim HLA-identisch transplantierten Patienten nicht völlig verhindern, wohl aber die Häufigkeit schwerer Graft-versus-Host Krankheit vermindern.

Die Kombination mehrerer monoklonaler Antikörper erwies sich als vorteilhaft, da vermutlich die Dichte einzelner Antigene zur Inaktivierung der T-Zellen nicht ausreichte (Prentice et al. 1984, Hervé et al. 1985). Für die Anwendung beim Menschen steht ein monoklonaler IgM-Antikörper (Campath-1) zur Verfügung, der autologes Komplement bindet und aktiviert. Dieser Antikörper konnte über 99% der T-Zellen aus dem Knochenmark eliminieren (Hale et al. 1983) und die Häufigkeit akuter Graft-versus-Host Krankheit signifikant reduzieren (Apperley et al. 1986). Waldmann et al. (1984) berichteten über 11 Hochrisiko-Patienten, die mit Campath-1 behandeltes Knochenmark erhalten hatten und keine akute Graft-versus-Host Krankheit nach bis zu 12 Monaten entwickelten . In einer grösseren Studie mit über 280 Patienten trat nur bei 12% der Knochenmark-Empfänger Graft-versus-Host Krankheit Grad II bis IV auf (Hale et al 1987). In 14% der Fälle wurde das Transplantat allerdings abgestoßen. Monoklonale Antikörper gegen das T-Zell-Antigen Thyl wurden in Verbindung mit Komplement bei Mäusen erfolgreich zur GvH-Prophylaxe verwendet (Muto et al. 1981, Ferrara et al. 1986). Mit Anti-Thyl depletiertes Knochenmark von inkompatiblen Spendern wurde allerdings häufig abgestoßen (Vallera et al. 1982).

Eine Möglichkeit, die biologische Aktivität der Antikörper zu erhöhen, ist ihre Bindung an Ricin. Die Bindung monoklonaler Antikörper an das Pflanzentoxin Ricin führt zur Bildung eines Komplexes, der in der Lage ist, Targetzellen abzutöten. Vallera et al. (1982) transplantierten Mäusen inkompatibles Knochenmark und konnten durch die Inkubation des Transplantates mit dem Ricin-Antikörper-Komplex die

Mortalität nach Transplantation von über 90% auf unter 10% senken. Er verwendete einen Anti-Thy1.2 Antikörper. Auch beim Menschen wurde diese Methode erfolgreich eingesetzt (Filipovich et al. 1985).

Eine weitere Möglichkeit, T-Zellen mit Hilfe immunologischer Methoden zu depletieren, ist die Rosettierung. Sie wurde durch Coombs et al. (1981) etabliert und wird heute auch zur T-Zell-Depletion von Knochenmark-Transplantaten eingesetzt. Menschliche T-Zellen rosettieren mit Schaferythrozyten spontan über einen SRBC-Rezeptor. Fischer et al. (1986) depletierten 99-99,9% der rosettierten T-Zellen über Dichtegradienten. Mit zusätzlicher Immunsuppression nach Transplantation konnten so 5 Patienten mit kombiniertem Immundefekt hämatologisch rekonstituiert werden, ohne schwere Graft-versus-Host Krankheit zu entwickeln. Reisner et al. (1980) kombinierten diese Rosettenseparation mit der Agglutination humaner T-Lymphozyten mit Sojabohnen-Lektin. 10 Patienten erhielten auf diese Weise depletiertes Knochenmark von HLA-identischen Spendern, das in allen Fällen anwuchs und nur bei einem Patienten milde Graft-versus-Host Krankheit hervorrief (Slocombe et al. 1986). Die Antikörper-vermittelte Rosettierung wurde von Wilhelm et al. (1986) zur T-Zelldepletion beim Menschen ausgearbeitet.
Eine weitere Verbesserung der Rosettenseparation gelang Vartdal et al. (1987) mit der Verwendung magnetischer "beads". Mit dieser verbesserten Methode war eine nachweisbare Elimination von 99,98% der T-Zellen möglich.

Viele Voraussetzungen für die erfolgreiche klinische Knochenmarktransplantation wurden an grösseren Tieren modellhaft ausgearbeitet. Hierzu zählt die Methode der Ganzkörperbestrahlung, die Auswahl MHC-kompatibler Geschwister in der Familie und die prophylaktische immunsupressive Behandlung nach Transplantation zur Verhütung einer Graft-versus-Host Reaktion. Eine erfolgreiche Depletion von T-Zellen aus dem Transplantat mittels monoklonaler Antikörper

wurde allerdings beim Hund bislang nicht ausgearbeitet. Als Grund hierfür kann die geringe Anzahl verfügbarer monoklonaler Antikörper gegen Hunde-T-Zellen gelten. Die meisten bisher beschriebenen Antikörper zeigen Kreuzreaktionen mit anderen Zellen als T-Zellen (Tabelle 1a). Anders als bei Maus und Mensch sind Antigene auf T- und B-Lymphozyten durch monoklonale Antikörper noch ungenügend definiert. Mysliwietz et al. (1987) entwickelten einen monoklonalen Antikörper (9G5), der sich durch hohe Reaktivität mit Thymuszellen und T-Zellen im peripheren Blut auszeichnet. Dieser Antikörper stand für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung.

Tab. 1 a)

Monoklonale Antikörper gegen T-Lymphozyten des Hundes

Bez.	Ig-Kl.	Immunfluoreszenz/PAP positive Zellen Thymus	Ly.kn.	Milz	PBL	KM	DT	Immunhistologie	Funktionelle Nachweise MLC-Inhib./CFU-Inhib.		Antigen MG	Literaturzitat
DT2	IgG2a	72-84%	n. d.	n. d.	33-55%	n. d.	39-71%	n. d.	Responder nicht Stim. nicht CTL	n. d.	72 KD	Wulff J et al.1982 Transpl. 33:616
		PBL-NADC 73-84%, PBL-ADC 6-11%										
DLy1	IgG2b	5-30%	n. d.	n. d.	ü. 90%	n. d.	ü. 90%	n.d.	hemmt MLC mit C´ nicht CTL	hemmt CFU-GM nicht CFU_E	213 KD	Wulff J et al.1982 Exp.Hematol. 10:609
		über 90% Monozyten, über 90% Granulozyten										
DLy6	IgM	-60%	n. d.	n. d.	ü. 90%	n. d.	ü. 90%	n. d.	hemmt MLC mit C´ nicht CTL	nicht CFU	60 KD	Urban CH et al.1983 Transpl. 35:469
Aby 6C6	IgG2b	n. d.	34%	n. d.	67%	61%	n. d.	14% Thymusmark T+B-Z. in LK/Milz Haut/Basalz.	n. d.	n. d.	n. d.	Kraviec DL et al. 1984, Am.J.Vet. Res.45:499
Aby 1A1	IgM	n. d.	37%	n. d.	61%	9%	n. d.	73% Thy.mark/-rinde T-Z. in LK u. Milz Gehirn u. Bindegew.	n. d.	n. d.	n. d.	Kraviec DL et al. 1984, Am.J.Vet. Res.45:491
F3-20-7	IgG1	99%	65%	n. d.	n. d.	16%	n. d.	Basalmembranen in Haarfoll. u. Niere	n. d.	n. d.	25 KD	McKenzie J,Fabre J. 1981, Transpl. 31:275
		KM-B-Zellen z. T. positiv										
B2E8	IgG2b	Bindungsingibition mit 7.2.										Aléjandro R et al. 1984,Transpl.38:542
7.2.	IgG2b	6%	42%	n. d.	39-72%	11%	65%	n. d.	hemmt MLC mit C´	hemmt CFU	29+32 KD	Deeg HJ et al.1982 Immunogenetics 16:445
		Anti-human-Ia-Antikörper										
T811	IgG1	40%	n. d.	n.d.	19-27%	n. d.	n. d.	n. d.	bis 35% der CTL	n. d.	human 32 KD	Szer J et al.1985 Exp.Hematol.
		Anti-human-CD8, nur F3-20-7-positive Z.										
WMD1	IgM	90%	n. d.	33%	66%	26%	75%	n. d.	hemmt MLC hemmt CML	hemmt CFU	n. d.	Prendergast M et al.1986 Transpl.41:556
		Anti-Thy1										
WM2	IgG2a	u. 1%	n. d.	50%	40%	13%	60%	n. d.	n. d.	nicht CFU	28+32 KD	Prendergast M et al.1986 Transpl.41:556
		Anti-human-Ia										
9G5	IgG2b	91%	72%	n. d.	58%	2% Welpen	n. d.	Thym.rinde+-mark T-Areale in Milz u. Lymphknoten	n. d.	nicht CFU	115+160KD	Mysliwietz J et al. Transpl. in press

Abkürzungen

ADC = Adhärente Zellen
AS = Ausgangssuspension
ATG = Antithymozytenglobulin
B = Bodensatz
BC = Buffy Coat = Ring kernhaltiger Blutzellen
BRBC = Bovine Red Blood Cells
C´ = Complement
CFU_E = Colony Forming Units, Erythrocytes
CFU_{GM} = Colony Forming Units, Granulocyte, Monocyte
CSA = Colony Stimulating Activity
CTL = Cytotoxic T-Lymphocyte
DT = Ductus Thoracicus
FCS = Fetal calf serum
FITC = Fluorescein-Isothiocyanat
GvH = Graft-versus-Host
I = Interphase
Ig-Kl. = Immunglobulin-Klasse
Kan-N-IgG= Normalimmunglobulin G vom Kaninchen
KD = Kilodalton
KG = Körpergewicht
KM = Knochenmark
Ly.kn. = Lymphknoten
MLC = Mixed Lymphocyte Culture
MNC = Mononuclear Cells
MoAk = Monoklonaler Antikörper
Ms-N-IgG= Normalimmunglobulin G von der Maus
NADC = Nicht adhärente Zellen
N-IgG = Normalglobulin G
PBL = Peripheres Blut
PLL = Poly-L-Lysin
RFC = Rosette Forming Cells
RPM = Rotation Per Minute,
1800 RPM entspricht 500 g
1200 - 1500 RPM entspricht 200 - 300 g
2700 RPM entspricht 1000 g
SPA = Staphylokokkenprotein A
SRBC = Sheep Red Blood Cells
SPA-SRBC= Staphylokokken-Protein-A beschichtete Schaferythrozyten

Zur Bezeichnung der monoklonalen Antikörper siehe Tabelle 1a nach Seite 15

Material

1. Zellkulturmedien

Hanks Salzlösung "1x mit Natriumbicarbonat", Fa. Seromed, über Fa. Biochrom, Berlin

RPMI 1640 Medium "1x mit 20 mM Hepes-Puffer", ohne Phenolrot, ohne Natriumbicarbonat, Fa. Seromed, über Fa. Biochrom, Berlin

Medium 199 "1x mit Hanks Salts, Hepes und L-Glutamin", Fa. Gibco, über Fa. Nunc, Wiesbaden

McCoys 5a Medium (Mod), ohne Serum, mit L-Glutamin, Fa. Gibco, über Fa. Nunc, Wiesbaden

McCoys 5a Medium mit Zutaten : McCoys 5a Medium mit Na-Pyruvat, Eagles MEM Vitamines, Eagles MEM Aminosäuren, Eagles MEM nicht essentielle Aminosäuren, L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin, Fa. Gibco, über Fa. Nunc, Wiesbaden, sowie Na-Pyruvat, Fa. Seromed, über Fa. Biochrom, Berlin und L-Serin, L-Asparagin, Fa. Merck, Darmstadt.

BSA : Bovines Serum Albumin, Fraktion 5, Fa. Sigma, Deisenhofen

FCS : Fetales Kälberserum, Fa. Boehringer-Mannheim, Mannheim

CSA : Colony Stimulating Activity, selbst hergestellt aus Serum Busulfan (25mg p. o.) behandelter Hunde

Agar : Bacto-Agar, 3%ig, Fa. Difco über Fa. Hedinger, Stuttgart

Hanks mit Na-Azid : 1,86 mg Natriumazid, Fa. Serva, Heidelberg, in 1 ml Hanks-Salzlösung

PBS: 0,81% Natriumchlorid in Phosphatpuffer 0,0067M, pH 7,2, isotonisch, Apotheke der klinischen Universitätsanstalten, München

2. Gerinnungshemmer

Alsever Lösung, Seromed, Biochrom, Berlin
Heparin Novo, Novo Industrie, Mainz

3. Reagentien

SPA : Protein A von Staphylococcus aureus, gefriergetrocknet, Fa. Pharmacia, Freiburg
Chromchlorid : Chrom(3)chlorid-6-hydrat, Fa. Merck, Darmstadt
Hämolytischer Puffer : 0,83% Ammoniumchlorid, 0,1% K-Bicarbonat, 0,00372% EDTA-Titriplex, KOH bis pH 7,4 Fa. Merck, Darmstadt, Aqua dest., Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Silicon - Lösung : Fa. Sigma, Deisenhofen
PLL : Poly-L-Lysin, 10 mg/ml, Fa. Sigma, Deisenhofen, verdünnt mit PBS 1:2000
Gummi Arabicum, Fa. Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd : 25% in Wasser, Fa. Serva, Heidelberg, 0,25%ig verwendet

4. Dichtegradientenmedien

Ficoll-Isopaque 1,077 aus der Apotheke der klinischen Universitätsanstalten, München
Percoll, Fa. Pharmacia, Freiburg

5. Blut- und Knochenmark

Blut und Knochenmark wurden Hunden der GSF München entnommen. Es handelte sich um Beagles, die 9 bis 15 Monate alt und durchschnittlich 13 kg schwer waren. Die Hunde wurden regelmässig geimpft (Staupe, HCC, Leptospirose) und entwurmt. Die Entnahme des Blutes erfolgte aus der Vena jugularis, die des Knochenmarks aus dem Beckenkamm. Blut und Knochenmark wurden mit Heparin (0,1 ml auf 10 ml Blut bzw. 0,2 - 0.4 ml auf 5 ml Knochenmark) vermischt.

6. Schaferythrozyten,Rindererythrozyten

Gesunden Schafen der GSF München wurde Blut aus der Vena jugularis entnommen und 1 : 1 mit Alsever Lösung vermischt. Rindererythrozyten zur Kopplung mit SPA wurden mir von Herrn Prof. Dr. Rieber, Institut für Immunologie, Universität München, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

7. Antikörper und Antiserum

Das Antiserum ATG 1202 (Anti-Thymozyten-Globulin) wurde im Institut für Immunologie (Prof. S. Thierfelder) der GSF München durch Immunisierung von Kaninchen mit Thymuszellen neugeborener Welpen hergestellt . Das ungereinigte Serum wurde 1 x mit Leberhomogenat, 1 x mit Nierenhomogenat, 3 x mit Milzhomogenat, 2 x mit Erythrozyten und 1 x mit Knochenmark vom Hund absorbiert. Die Globulin-Fraktion wurde durch Ammoniumsulfatpräzipitation gewonnen.
Der monoklonale Antikörper 9G5 wurde mir von Herrn Mysliwietz, Institut für Hämatologie, München, zur Verfügung gestellt (Mysliwietz et al. 1987). Es handelt sich um einen Anti- Hunde-T-Zell-Antikörper der Maus der Klasse IgG 2b.
Als Zweitantikörper wurden FITC-konjugierte Ziege-anti-Maus, bzw. Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, sowie unkonjugierter Kaninchen-anti-Maus-IgG Antikörper der Fa. Sigma, Deisenhofen verwendet.

Methoden

1. Waschvorgänge

Um Ficoll-Reste bzw. überschüssigen Antikörper zu entfernen, mußten die Zellsuspensionen mehrmals gewaschen werden. Die Suspensionen wurden bei 1200 - 1500 RPM 10 Minuten zentrifugiert. Um den Zellverlust möglichst gering zu halten, sollte die Zentrifuge ungebremst auslaufen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand sorgfältig abgekippt oder abgehoben und mit frischem Medium aufgefüllt.

2. Beschichtung von Erythrozyten mit Staphylokokkenprotein A mittels Chromchlorid

Das lyophilisierte SPA wurde in physiologischer NaCl-Lösung in entsprechender Konzentration (1mg/ml bzw. 4 mg/ml) gelöst und in 250 µl Portionen eingefroren aufbewahrt. Das 1 : 1 mit Alsever-Lösung vermischte Schafblut wurde in physiologischer NaCl-Lösung dreimal gewaschen und der "Buffy Coat" sorgfältig entfernt. 250 µl der gewaschenen und gepackten Schaferythrozyten wurden in 2,5 ml physiologischer Natriumchloridlösung mit 0,165mg Chromchlorid und 250 µ SPA suspendiert
Die Suspension inkubierte 1 Stunde bei 37°C und wurde dann 3 mal gewaschen. Die beschichteten Schaferythrozyten wurden in Hanks mit Na-Azid bis zum Verbrauch (maximal 5 Tage) aufbewahrt.

3. Herstellung eines Percoll-Gradienten

Zur Herstellung eines Percoll-Gradienten wurden benötigt: Percoll-Stammlösung, PBS Dulbecco's "10x", 0,02 molare Natronlauge und Aqua dest.

Das benötigte Volumen an Percoll-Stammlösung konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$Vo = V \frac{p - 0{,}1\ pi - 0{,}9}{po - 1}$$

Vo = Volumen der benötigten Stammlösung
v = Volumen der gerzustellenden Arbeitslösung
p = gewünschte Dichte der Arbeitslösung
po = Dichte der Percoll-Stammlösung
pi = Dichte der, auf das Endvolumen verdünnten, PBS-Lösung = 1,058

9 Teile Percoll-Stammlösung und 1 Teil PBS 10x wurden gemischt und der pH-Wert auf 7,35 mit 0,02 molarer Natriumchloridlösung eingestellt. Erst dann wurde mit Aqua dest. auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt.

4. Rosettierung

Zur Rosettierung wurden die aus dem Blut bzw. Knochenmark durch Ficoll-Separation gewonnenen mononukleären Zellen in Hanks Salzlösung mit 0,1 % BSA (Bovines Serum Albumin) suspendiert und auf 5 x 10^6 MNC/ml eingestellt. Der verwendete Antikörper bzw. das Antiserum wurde in Hanks Salzlösung verdünnt und mit der Zellsuspension 1 : 1 vermischt. Daraufhin inkubierte die Suspension eine Stunde auf Eis.
Der Antikörperüberschuß wurde durch zweimaliges Waschen mit Hanks mit 0,1 % BSA entfernt. Die 0,5%ige SPA-SRBC-Suspension wurde im Volumenverhältnis 2 : 1 der Zellsuspension zugegeben. Ein Abzentrifugieren dieser Mischung bei 1200 RPM für 15 Minuten war für einen engen Kontakt zwischen mononukleären Zellen und Schaferythrozyten notwendig. Die Zentrifuge lief jeweils ungebremst aus, um ein Aufschütteln zu

vermeiden.
Der so erhaltene Zellknopf inkubierte eine Stunde auf Eis und konnte dann resuspendiert werden.

5. Dichtegradientenzentrifugation zur Rosettenseparation

Als Dichtegradientenmedium zur Rosettenseparation wurde Percoll der Dichte 1,085 verwendet. 7 ml der Percoll-Lösung wurden in ein 25 ml Glasröhrchen (silikonisiert) pipettiert und mit maximal 10 ml rosettierter und resuspendierter Zellsuspension überschichtet. Nach Zentrifugation bei 2700 RPM für 20 Minuten wurde die Interphase sorgfältig abgehoben. Die Gewinnung einer Probe zur Rosettenzählung aus Interphase und Bodensatz erfolgte sofort (nach Entfernung von Interphase und Überstand und Resuspendierung).
Für erythrozytenfreie Zellsuspensionen wurden die beiden Fraktionen in hämolytischem Puffer und daraufhin in Zellkulturmedium gewaschen.

6. Immunfluoreszenz mit PLL-beschichteten Objektträgern

a) Präparation der Objektträger

Die Objektträger wurden zunächst je 1 1/2 Stunden in Äthanol/Salzsäure (49% Athanol, 0,75% Salzsäure in Aqua dest.) und Äthanol/Äther (1 :1) eingelegt und getrocknet. Auf die trockenen Objektträger wurden je 12 Tropfen Gummi Arabicum mit 4 mm Durchmesser aufgebracht und übernacht getrocknet. Nachdem die Gummi Arabicum-Tropfen mit Aqua dest. abgelöst worden waren, wurden die entstandenen runden Reaktionsfelder zunächst mit Natronlauge (20%) für 10 Minuten und dann mit PLL-Lösung (1 : 200 in Hanks) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden mit anhaftenden PLL-Tropfen sofort bei -20°C eingefroren.

b) Durchführung

Die aufgetauten Objektträger wurden mit Hanks gründlich gespült und pro Reaktionsfeld 20 µl der Zellsuspension (5×10^6 MNC/ml in RPMI 1640 Medium) aufgebracht. Nach kurzem Schütteln und 12 Minuten Inkubationszeit wurde mit je 20 µl autologem Serum für weitere 12 Minuten inkubiert, um freie Bindungsstellen des PLL abzudecken. Das autologe Serum wurde durch mehrmaliges Waschen entfernt und die anhaftenden Zellen mit der Antikörperverdünnung für 10 Minuten inkubiert. Durch erneutes Waschen wurde überschüssiger Antikörper entfernt und die Zellen nun mit FITC-konjugiertem Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen Antikörper für 10 Minuten inkubiert. Die so markierten Zellen wurden mit Glutaraldehyd 1 : 400 in Hanks mit 20% autologem Serum für 15 Minuten fixiert.
Die Auswertung erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop.
ATG 1202 markierte Zellen wurden bei ringförmiger Fluoreszenz als positiv gewertet.
MoAK 9G5 markierte Zellen wurden bei punktförmiger Fluoreszenz als positiv gewertet.

7. CFU_{GM}-Kulturen

Die, bisher steril behandelten, mononukleären Zellen wurden in Medium 199 suspendiert und auf $1,6 \times 10^6$ MNC/ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 0,25 ml der Zellsuspension mit 1,95 ml McCoy's Medium mit Zutaten (steril), 0,6 ml FCS (steril und inaktiviert) und 0,4 ml verflüssigtem Agar (steril, 3 %ig) gemischt. Je 0,8 ml der Mischung wurden mit je 0,2 ml CSA in Petrischalen pipettiert (Durchmesser 30 mm) und 10 Tage im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Kulturen wurden unter dem Umkehrmikroskop ausgewertet, wobei Zellhaufen mit mehr als 50 Zellen als Kolonien klassifiziert wurden.

8. Separation über Nylonwolle

T-Lymphozyten des Hundes sind nicht an Nylon-Wolle adhärent (Holler et al. 1984). Durch die Separation über Nylon-Wolle erfolgte eine Trennung in adhärente und nichtadhärente Zellen. Zur Separation dienten Plastikstrohhalme (ca. 6 mm Durchmesser), die mit 100mg Nylonwolle gestopft waren. Dabei wurde das Ende des Strohhalmes bis auf ein kleines Loch zugeschweißt. Nach Spülung der Halme mit Hanks und anschliessend mit Hanks mit 10% FCS wurden die Halme und eine ausreichende Menge Hanks mit 10% FCS im Brutschrank auf 37 °C erwärmt. Die Suspension mononukleärer Zellen (in Hanks) wurde durch Abzentrifugieren auf 500 µl konzentriert, in den Strohhalm gegeben und mit etwas Medium in die Nylonwolle eingespült, sodaß das obere Ende der Nylonwolle mit Medium bedeckt blieb. Die Strohhalme inkubierten für 1 Stunde bei 37 °C.
Die nicht adhärente Fraktion wurde daraufhin mit erwärmtem Medium ausgespült, während die adhärente Fraktion im Anschluß daran durch sorgfältiges Kneten des Halmes abgelöst werden mußte.

9. Separation des Knochenmarks zur Transplantation

a) Gewinnung des Buffy Coats

Das Knochenmark wurde in silikonisierten Leukapheresegläsern 15 Minuten bei 2700 RPM zentrifugiert und der Buffy Coat abgehoben. Nach einer erneuten Zentrifugation des Plasmas und der Erythrozyten wurden die restlichen Leukozyten gewonnen.

b) Ficoll-Separation

Die 1 : 3 mit PBS verdünnte Zellsuspension wurde in sterilen silikonisierten Glasröhrchen über Ficoll 1,077 geschichtet

und 20 Minuten bei 2700 RPM zentrifugiert. Die abgehobene Interphase wurde 4 x gewaschen, davon 1 x mit hämolytischem Puffer und 3 x mit Hanks mit 0,1% BSA. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Zahl lebender Zellen wurde die Suspension auf 5 x 10^6 lebende MNC/ml eingestellt.

c) Inkubation mit MoAk 9G5

Die Zellsuspension wurde in Röhrchen zu je 2 ml 1 : 1 mit mit Antikörperverdünnung vermischt (MoAk 9G5 log 2-Verdünnung 5 in Hanks) und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Während die Zellen inkubierten, wurden die Röhrchen in 10 minütigem Abstand geschüttelt. Zur Entfernung des Antikörperüberschusses wurden die Suspensionen daraufhin 2 x mit Hanks mit 0,1% BSA gewaschen.

d) Inkubation mit SPA-SRBC

Je 10 x 10^7 MNC wurden mit 4 ml 5%iger SPA-SRBC-Suspension gründlich gemischt und 10 Minuten bei 1500 RPM abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend vorsichtig resuspendiert. In dieser Suspension wurde der Rosettierungsgrad bestimmt.

e) Separation über Percoll

Die Zellsuspension, bestehend aus rosettierten und nicht rosettierten MNC und SPA-SRBC, wurde nun mit Hanks auf je 10 ml verdünnt und in sterilen silikonisierten Glasröhrchen über die Percoll-Gebrauchslösung (Dichte 1,085, je 7 ml) geschichtet. Die Röhrchen wurden 20 Minuten bei 2700 RPM zentrifugiert und die Interphase abgehoben. Waren die MNC der Interphase zu mehr als 0,5% rosettiert, so wurde die Zellsuspension wieder mit Hanks auf je 10 ml aufgefüllt und erneut über Percoll zentrifugiert. Die Überstände an Percoll und Medium wurden verworfen und die Zahl der Rosetten im Bodensatz bestimmt. Daraufhin wurde der Bodensatz 3 x ge-

waschen, davon 1 x mit hämolytischem Puffer und 2 x mit Hanks, und die Zellzahl bestimmt.
In der abgehobenen Interphase wurden Zellzahl und Rosettenanteil bestimmt, die Suspension 2 x mit Hanks gewaschen und die Zellen in 30 ml Medium TC 199 suspendiert.
Zur Gewinnung eines Transplantates mit weniger als 0,5% Rosetten waren in der Regel 3 Separationen über Percoll nötig. Proben aller Fraktionen wurden bis zum nächsten Tag bei 4°C aufbewahrt. CFU_{GM}-Kulturen mit Zellen aus allen Fraktionen wurden am nächsten Tag angesetzt. Eine Immunfluoreszenzfärbung mit Zellen aller Fraktionen wurde ebenfalls am nächsten Tag durchgeführt.

10. Transplantation

Die in 30 ml TC 199 suspendierten Zellen der Interphase wurden langsam i. v. infundiert.

Ergebnisse

A) Erkennung von T-Lymphozyten mit absorbiertem ATG und monoklonalem Antikörper 9G5

1. Reaktivität des Antiserums ATG 1202 und des monoklonalen Antikörpers 9G5 in Rosettierung und Immunfluoreszenz

Die angestrebte Separation der T-Zellen aus dem Knochenmark setzte eine nachweisbare Bindung der verwendeten Antikörper an Knochenmarkzellen voraus. Um diese Bindung nachzuweisen, wurden die Antikörper-beschichteten Zellen mit SPA-beschichteten Schaferythrozyten rosettiert oder mit einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus, Ziege-anti-Kaninchen) markiert. Die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen ist abhängig von der Affinität des Antikörpers zum Antigen, während die Nachweisbarkeit dieser Bindung innerhalb der verwendeten Nachweisverfahren eine ausreichende Affinität des SPA bzw. des FITC-gekoppelten Zweitantikörpers, sowie, insbesondere für die Rosettierung, eine ausreichende Antigendichte auf der Zelloberfläche erfordert. Für diese Versuche wurden mononukleäre Zellen aus Knochenmark und Blut verwendet, da im Blut eine große Anzahl reifer T-Zellen enthalten ist.

1.1. Rosettierung in Blut und Knochenmark erwachsener Hunde

Die Rosettenbildung mit ATG 1202 und MoAk 9G5 in Blut und Knochenmark ist in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt. Dabei ist die Anzahl der verwendeten Werte am unteren Rand der Abbildungen vermerkt.
Bei Rosettierung mit ATG 1202 zeigte sich im Blut ein Plateau über mehrere Verdünnungsstufen bis zur Verdünnungsstufe 7. Die Antikörperkonzentration war somit bis zu dieser Verdünnungsstufe ausreichend zur Rosettierung aller ATG 1202-positiven Blutzellen. Bei weiterer Verdünnung des Antiserums

sank die Rosettierung ab bis auf den Anteil spontan rosettierender Zellen.
Bei Rosettierung mononukleärer Knochenmarkzellen mit ATG 1202 war die Plateaubildung weniger ausgeprägt.

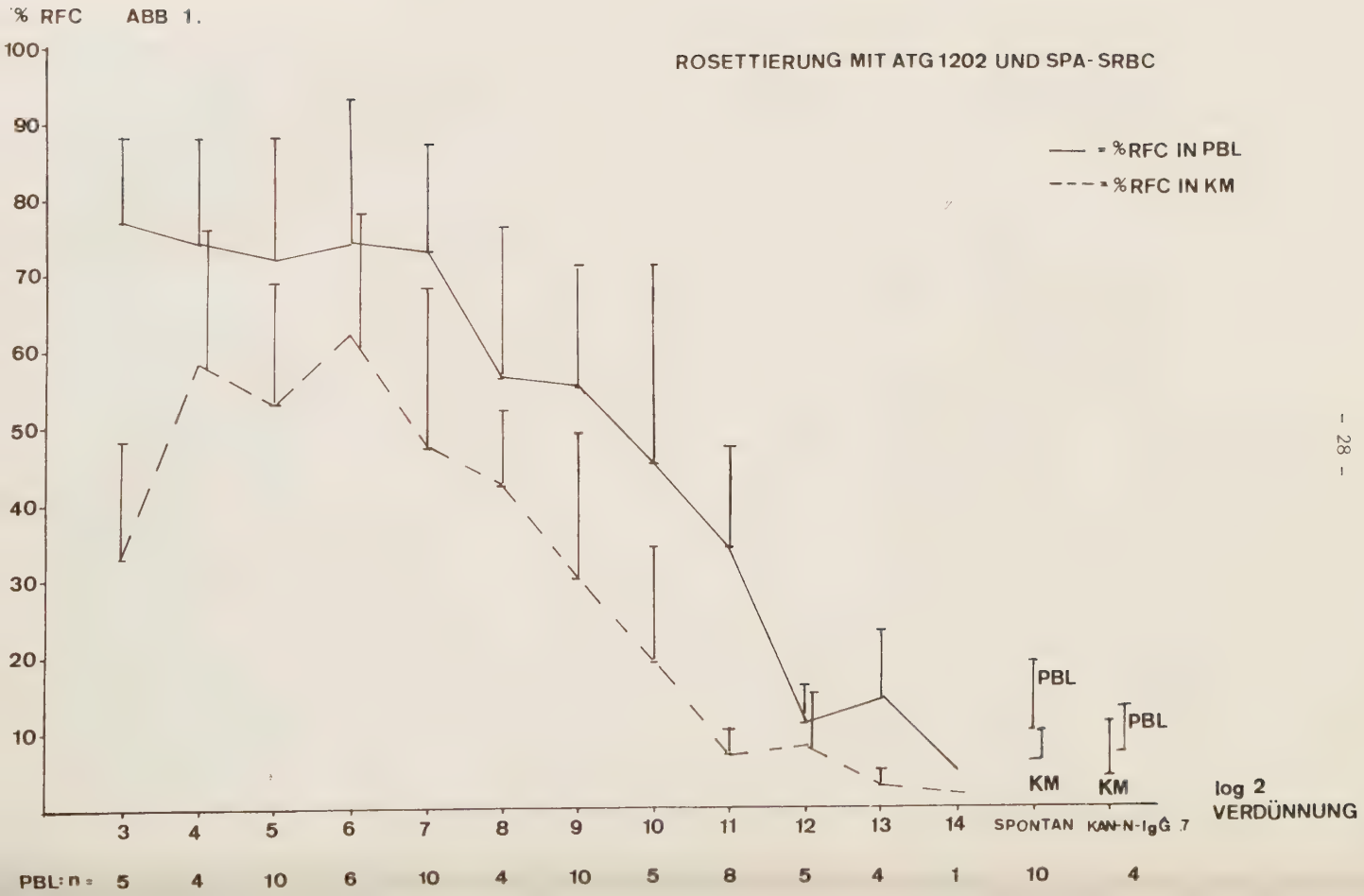
Auch mit MoAk 9G5 und mononukleären Blutzellen war eine Plateaubildung bis zur 7. Verdünnungsstufe zu erkennen, während die Rosettierung mononukleärer Knochenmarkzellen mit steigender Verdünnung kontinuierlich abnahm.

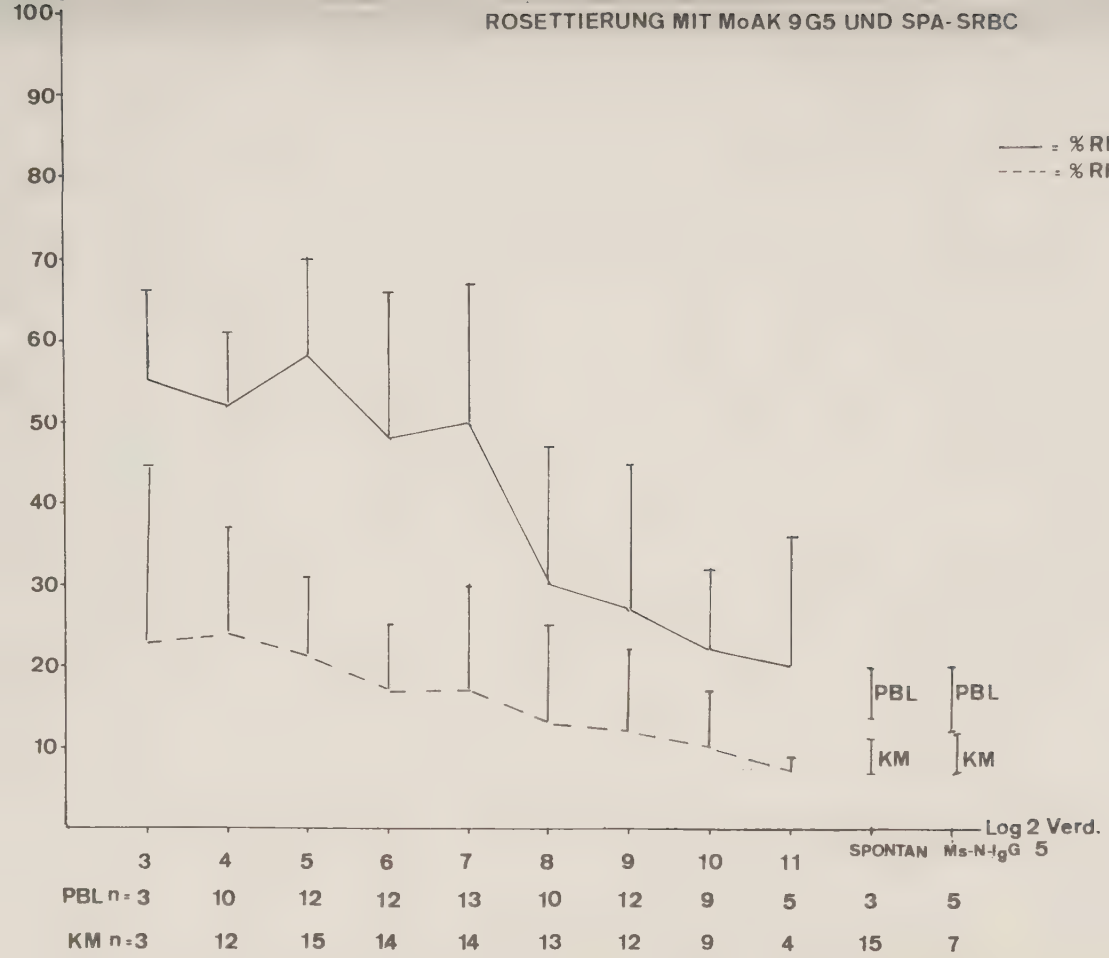
1.2. Immunfluoreszenz in Blut und Knochenmark erwachsener Hunde

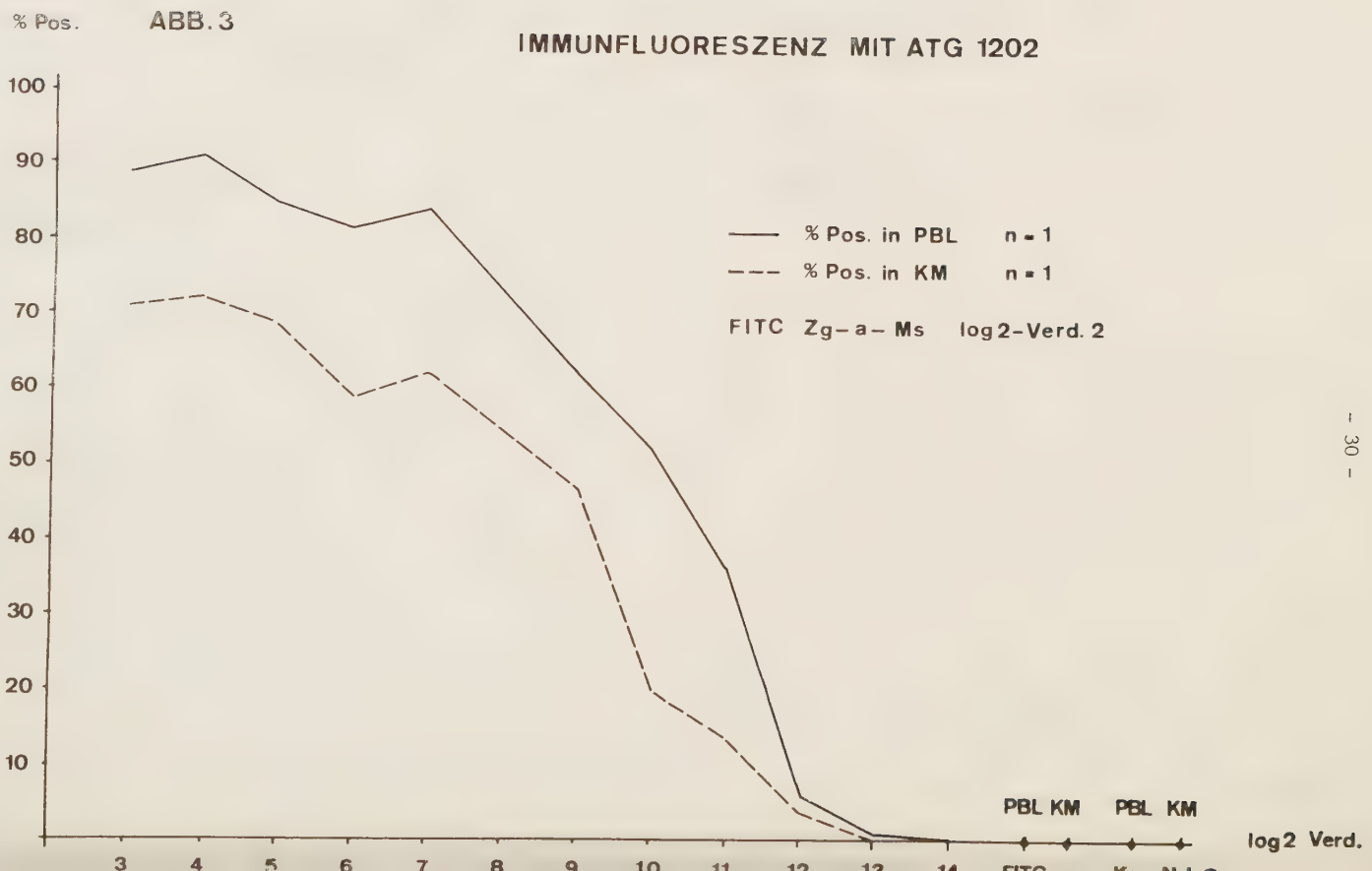
Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit ATG 1202 und MoAk 9G5 sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt. Die Anzahl der verwendeten Werte ist ebenfalls am unteren Rand der Abbildungen vermerkt.
Sowohl MoAk 9G5 als auch ATG 1202 markierten in der Immunfluoreszenz deutlich mehr Blut- und Knochenmarkzellen als in der Rosettierung, wobei die Zahl Immunfluoreszenz-positiver Zellen nur mit der Zahl tatsächlich durch MoAk 9G5 bzw. ATG 1202 vermittelter Rosetten (nach Abzug der Spontanrosetten) zu vergleichen ist.
Eine Plateaubildung war mit beiden Antikörpern im Blut deutlicher zu erkennen als im Knochenmark. Dieses Plateau reichte bei ATG 1202-markierten Blutzellen bis zur 7. Verdünnungsstufe, bei MoAk 9G5 markierten Blutzellen jedoch nur bis zur 5. Verdünnungsstufe.

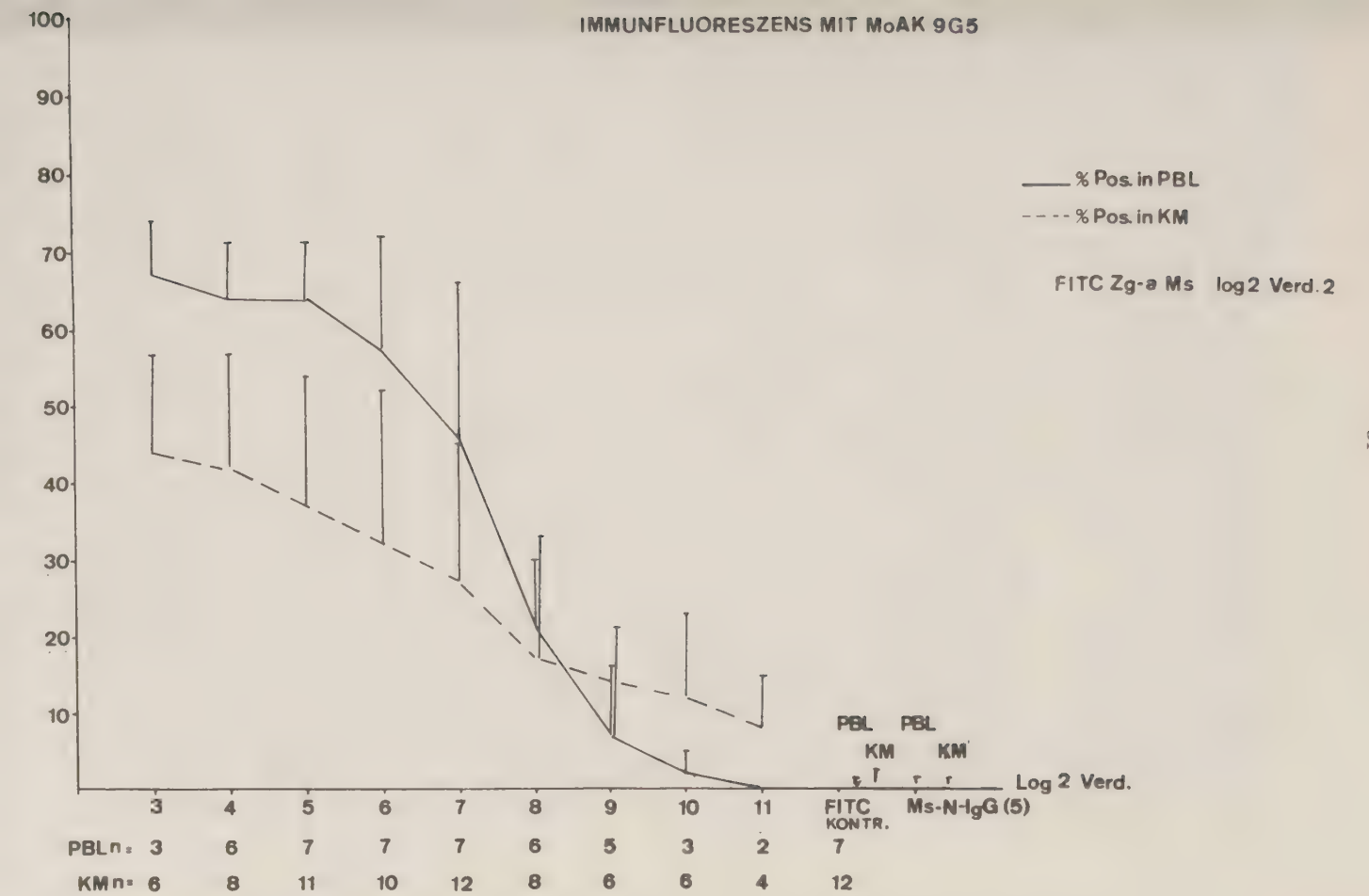
1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Das polyklonale Antiserum ATG 1202 enthält Antikörper unterschiedlicher Affinität, die in unterschiedlichem Ausmaß zur Rosettierung beitragen. Der Einfluß der Antigendichte kommt hinzu, so daß hier zwei Mechanismen wirksam sind. Da die T-Zellen im Blut überwiegend ausgereift sind, bilden sie eine Population mit relativ einheitlicher Antigen-Dichte.


% RFC
ABB 1.
ROSETTIERUNG MIT ATG 1202 UND SPA-SRBC
= %RFC IN PBL
= %RFC IN KM
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
PBL
PBL
KM
KM
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 SPONTAN KAN-N-IgG
log 2
VERDÜNNUNG
PBL: n = 5 4 10 6 10 4 10 5 8 5 4 1 10 4


ROSETTIERUNG MIT MoAK 9G5 UND SPA-SRBC
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
—— = % RFC IN PBL
- - - - = % RFC IN KM
PBL
PBL
KM
KM
Log 2 Verd.
3 4 5 6 7 8 9 10 11 SPONTAN Ms-N-IgG 5
PBL n = 3 10 12 12 13 10 12 9 5 3 5
KM n = 3 12 15 14 14 13 12 9 4 15 7


% Pos.
ABB. 3
IMMUNFLUORESZENZ MIT ATG 1202
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
% Pos. in PBL n = 1
% Pos. in KM n = 1
FITC Zg–a–Ms log2-Verd. 2
PBL KM PBL KM
log2 Verd.
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14


IMMUNFLUORESZENS MIT MoAK 9G5
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
% Pos. in PBL
% Pos. in KM
FITC Zg-a Ms log2 Verd. 2
PBL
PBL
KM
KM
Log 2 Verd.
3 4 5 6 7 8 9 10 11
FITC KONTR.
Ms-N-IgG (5)
PBL n = 3 6 7 7 7 6 5 3 2 7
KM n = 6 8 11 10 12 8 6 6 4 12

Dies erklärt die Plateaubildung bis zur 7. Verdünnungsstufe. Bei weiterer Verdünnung des Antiserums trugen schwach affine Antikörper nicht mehr zur Rosettierung bei, und die Zahl Rosetten bildender Zellen sank. Im Knochenmark beeinflußte die sehr unterschiedliche Antigendichte der Zellen die Rosettierung, so daß eine Plateaubildung nicht in diesem Ausmaß zustande kam.

Monoklonale Antikörper, wie der MoAk 9G5, haben eine einheitliche Affinität, und die Rosettierung wird hauptsächlich durch die Antigendichte auf der Zelloberfläche bestimmt.
Bei Rosettierung mononukleärer Blutzellen mit steigenden Antikörperverdünnungen sank die Zahl Rosetten-bildender Zellen mit dem Ende des Plateaus rasch, da bei stärkerer Verdünnung des Antikörpers eine große Population reifer Blut-T-Zellen mit einheitlicher Antigendichte nicht mehr erfasst wurde. Die heterogene Zusammensetzung des Knochenmarks ließ keine Plateaubildung zu, und der relativ flache Kurvenverlauf deutete darauf hin, daß Zellen mit sehr unterschiedlicher Antigendichte an der Rosettierung beteiligt waren.

In der Immunfluoreszenz wurden mehr ATG 1202- bzw. MoAk 9G5-positive Zellen erfasst, als in der Rosettierung. Dies wyrde dadurch erklärt, daß eine relativ hohe Zahl von Antikörpermolekülen auf der Zelloberfläche haften mußte, um eine Rosettierung zu ermöglichen, während die Immunfluoreszenz auch eine geringere Antikörper-Bindung nachweisen konnte. Eine geringe Antigendichte auf der Zelloberfläche bedingte eine geringe Antikörper-Bindung, so daß Zellen mit geringer Antigen-Dichte nur in der Immunfluoreszenz erfasst wurden, während Zellen mit hoher Antigendichte mit SPA-SRBC Rosetten bildeten.

Absorbierte Antithymozytenglobuline enthalten Antikörper, die gegen unterschiedliche Antigene gerichtet sind. Nur ein Teil dieser Antikörper erkennt spezifisch T-Zell-Antigene. Durch die Absorption der Antithymozytenglobuline wird ihr

Gehalt an Antikörpern, die mit Nicht-T-Zellen reagieren, zwar vermindert, diese Antikörper werden jedoch nicht völlig eliminiert. Antithymozytenglobuline markieren somit nur in einem bestimmten Titerbereich, im dem die Konzentration der Antikörper gegen Nicht-T-Zellen zu gering, die Konzentration der Antikörper gegen T-Zellen aber noch ausreichend ist, überwiegend T-Zellen. Die Titerstufe, bei der eine bestmögliche Unterscheidung zwischen T-Zellen und anderen Zellen durch das Antithymozytenglobulin stattfindet, ist durch das Ende des Plateaus in Rosettierung und Immunfluoreszenz mononukleärer Blutzellen gekennzeichnet. Für ATG 1202 liegt das Ende dieses Plateaus bei Titerstufe 7, so daß diese Verdünnung des ATG 1202 für alle weiteren Versuche beibehalten wurde.
Der monoklonale Antikörper 9G5 wurde in den weiteren Versuchen in einer log 2-Verdünnung von 5 verwendet, da in dieser Verdünnung noch alle Immunfluoreszenz-positiven Blutzellen erfasst werden konnten. Von diesen positiven Blutzellen wurde angenommen, daß sie eine Population reifer T-Zellen bildeten und damit als Anhaltspunkt für die zu verwendende Antiköper-Verdünnung dienen konnten. Die Tatsache, daß das Sättigungsplateau des Antikörpers in der Immunfluoreszenz nur bis zur Verdünnungsstufe 5 reichte, im Gegensatz zur Rosettierung, wurde mit einer geringeren Affinität des FITC-gekoppelten Zweit-Antikörpers zum MoAk 9G5 im Vergleich zum SPA erklärt.

2. Charakterisierung des ATG 1202 und des MoAk 9G5

T-Zell-Antigene des Hundes sind nur mangelhaft durch monoklonale Antikörper definiert. Die Sezifität der verwendeten Antikörper konnte nur anhand der Gewebeverteilung (Thymus, Milz und Knochenmark) des Antigens und anhand der Reaktivität der Antikörper in Zellsuspensionen mit unterschiedlichem T-Zell-Gehalt getestet werden. Ein qualitativer Nachweis für die T-Zell-spezifische Gewebeverteilung wurde von Frau Hoffmann-Fezer (mündliche Mitteilung) für ATG 1202 und für MoAk

9G5 in der Immunhistologie erbracht. Mysliwietz et al (1987) testeten den MoAk 9G5 in Zellsuspensionen aus Organen neugeborener Welpen durch Immunoperoxidasefärbung und fanden mit dieser Methode eine T-Zell-spezifische Reaktivität des Antikörpers. Die Rosettierung und Immunfluoreszenz in Zellsuspensionen aus Organen mit unterschiedlichem T-Zell-Gehalt und in Nylon-Wolle separierten Zellsuspensionen diente der Ergänzung und Bestätigung dieser Ergebnisse und gab Hinweise auf die Vergleichbarkeit der verwendeten Methoden.

2.1. Vergleich von Organen mit unterschiedlichem T-Zell-Gehalt

Um die Spezifität der verwendeten Antiseren zu prüfen, wurden Zellen aus Milz, Thymus und Knochenmark neugeborener Welpen gewonnen und die Zahl der Zellen bestimmt, die Rosetten bildeten und in der Immunfluoreszenz positiv reagierten. Der Thymus wurde als T-Zell-reiches Organ den T-Zell-armen Organen Milz und Knochenmark gegenübergestellt. Zur Gewinnung der verwendeten Zellsuspensionen stand für ATG 1202 und MoAk 9G5 nur jeweils ein Welpe zur Verfügung. Um Rosettierung und Immunfluoreszenz durchführen zu können, wurden die Suspensionen bis zum nächsten Tag bei 4 °C aufbewahrt. Die Rosettenbildung wurde am Tag der Organentnahme, die Immunfluoreszenz jedoch am nächsten Tag getestet.

2.1. 1. Rosettierung

Die Ergebnisse der Rosettierung sind in Tabelle 1 dargestellt. Da die indirekte Rosettierung mit SPA-SRBC durchgeführt wurde, bildeten reife, Oberflächenimmunglobulin tragende B-Zellen stets Rosetten. Ihre Zahl wurde separat ohne Antikörperzugabe bestimmt (Spontanrosetten). Die Zahl spontan rosettierender Zellen repräsentiert nicht den gesamten B-Zellgehalt einer Zellsuspension, da Plasmazellen (Holler, mündliche Mitteilung 1987), und unreife B-Zellen nicht spontan rosettieren. Die Rosettierung mit Kaninchen-

Normal-IgG bzw. Maus-Normal-IgG diente als Kontrolle zum Ausschluß kreuzreagierender Antikörper im Serum der beiden Tierarten, von denen die verwendeten Antiseren stammten.

a) Milz

Milzzellsuspensionen neugeborener Welpen enthalten relativ viele reife B-Zellen. Dementsprechend hoch war in beiden Fällen die Spontanrosettierung. Die Kontrollen mit Kaninchen-Normal-IgG bzw. Maus-Normal-IgG entsprachen in etwa der Spontanrosettierung. Die Zellsuspensionen enthielten nur sehr wenige reife T-Zellen. Beim Vergleich der durch Antikörper vermittelten Rosetten wurde deutlich, daß das Antiserum ATG 1202 mit einem weit größeren Teil der mononukleären Zellen reagierte, als der monoklonale Antikörper 9G5

b) Thymus

Dem geringen B-Zell-Gehalt entsprechend bildeten Thymuszellen nur wenige Spontanoder Normal-Globulin-Rosetten. Der Anteil spezifisch durch ATG 1202 bzw. MoAk 9G5 vermittelter Rosetten war mit beiden Antiseren hoch und deutete daraufhin, daß die T-Zellen im Präparat von beiden Antiseren erkannt wurden.

c) Knochenmark

Ähnlich wie bei Verwendung von Thymuszellen war die Spontan- und Normalglobulin-Rosettierung aufgrund des niedrigen Gehaltes Oberflächen-Immunglobulin tragender B-Zellen gering. Da das Knochenmark neugeborener Welpen nicht durch Aspiration gewonnen wurde, war die Blutbeimengung und damit auch der T-Zell-Gehalt äusserst gering. Nur wenige Knochenmarkzellen bildeten mit MoAk 9G5 Rosetten. Das polyklonale Antiserum ATG 1202 reagierte jedoch auch hier mit vielen mononukleären Zellen.

2.1.2. Immunfluoreszenz

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Immunfluoreszenz erfaßt nur die vom Antiserum tatsächlich erkannte Zellpopulation. Die Zahl der Immunfluoreszenz-positiven Zellen kann somit nur mit der Zahl der Antikörper-vermittelten Rosetten verglichen werden, nach Abzug der Spontanrosetten. Falsch positive Werte, die durch Kreuzreaktionen des FITC-konjugierten Zweitantiköpers oder durch Antikörper im Normalserum der entsprechenden Tierart hervorgerufen wurden, konnten durch Kontrollen mit Normal-IgG von Kaninchen bzw. Maus ausgeschlossen werden.

a) Milz

Über 80 bzw. 90% der Milzzellen reagierten mit ATG 1202, obwohl dieses Antiserum an Milzzellen neugeborener Welpen absorbiert wurde. Der Anteil Immunfluoreszenz-positiver Zellen lag bei beiden Antiseren deutlich höher, als der mittels Antikörper Rosetten bildender Zellen.

b) Thymus

Im Vergleich zur Rosettenbildung war der Anteil Immunfluoreszenz-positiver Zellen bei beiden Antiseren gering. Dieser Effekt wurde auf die längere Aufbewahrungszeit der Zellen bei 4 °C zurückgeführt.

c) Knochenmark

Knochenmarkzellen reagierten zu einem hohen Prozentsatz mit ATG 1202. Die Reaktivität des MoAk 9G5 im Knochenmark in der Immunfluoreszenz war weit höher, als die von Mysliwietz et al. (1987) mit MoAk 9G5 im Knochenmark neugeborener Welpen festgestellte Reaktivität von 2%.

2.2. Vergleich von Zellsuspensionen mit unterschiedlichem T-Zellgehalt, die durch Separation über Nylon-Wolle gewonnen wurden.

Die Ergebnisse der Rosettierung und Immunfluoreszenz an Nylon-Wolle-separierten Zellen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die T-Zellen des Hundes sind nicht an Nylonwolle adhärent (Holler et al. 1984). Sie sind somit in der nicht adhärenten Fraktion (NADC) angereichert. Diese nicht adhärente Fraktion wurde als T-Zell-reiche Suspension T-Zell-armen Suspensionen gegenübergestellt. Oberflächen-Immunglobulin tragende B-Zellen waren überwiegend in der adhärenten Fraktion zu finden.

2.2.1. Rosettierung

In der Rosettierung mit ATG 1202 wurden die T-Zell-reichen Suspensionen Blut-MNC und NADC aus Blut mit der T-Zell-armen Suspension Knochenmark-MNC verglichen.
ATG 1202-vermittelte Rosetten waren in der nicht adhärenten Fraktion deutlich angereichert

In der Rosettierung mit MoAk 9G5 wurden nicht adhärente Blutzellen bzw. Knochenmarkzellen mit der jeweils adhärenten Fraktion verglichen. MoAk 9G5-Rosetten bildende Zellen waren fast nur in der nicht adhärenten Fraktion zu finden, während die Rosetten der adhärenten Fraktion zum größten Teil durch Oberflächenimmunglobulin tragende B-Zellen gebildet wurden.
Die Rosettenbildung mit MoAk 9G5 in Nylon-Wolle-separierten Knochenmark-Zellen war durch den geringen T-Zell-Gehalt des Knochenmarks niedriger, als bei Verwendung von Nylon-Wolle separierten Blutzellen. Eine Anreicherung rosettierter T-Zellen in der nicht-adhärenten Fraktion und spontan rosettierter B-Zellen in der adhärenten Fraktion war dennoch deutlich zu erkennen .

Tab. 1) erster Teil

Antikörper-Charakterisierung, Rosetten bildende Zellen in % RFC

	ATG 1202	n=	MoAk 9G5	n=	Spontanrosetten SPA 1	n=	SPA 4	n=	Normal-IgG Kan.	n=	Maus	n=
Neugeborene Hunde												
Thymus	100	1	68	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Milz	49	1	0	1	42	1	38	1	40	1	31	1
Knochenmark	77	1	15	1	4	1	5	1	5	1	17	1
Erwachsene Hunde												
Blut	64(11)	10	45(11)	12	10(8)	11	14(6)	3	7(6)	4	11(8)	5
Knochenmark	47(15)	8	16(7)	13	7(3)	10	7(4)	15	4(7)	6	7(5)	7
Blut												
NADC	67(11)	3	76(16)	2	4(3)	3	6(2)	2	-		15	1
ADC	-		9(8)	2	-		27(6)	2	-		-	
Knochenmark												
NADC	-		29(8)	3	-		4(2)	3	-		7(5)	3
ADC	-		11(11)	3	-		15(7)	3	-		14(2)	3

RFC mit ATG 1202 bzw. MoAk 9G5 = % RFC nach Abzug der Spontanrosetten

Antikörperverdünnung, log 2 : ATG 1202 - 7

MoAk 9G5 - 5

SPA 1 = Schaferythrozyten mit 1mg/ml SPA beschichtet.

SPA 4 = Schaferythrozyten mit 4mg/ml SPA beschichtet.

Mittelwerte und Standardabweichungen MW (SD)

Tab. 1) zweiter Teil

Antikörper-Charakterisierung, Immunfluoreszenz positive Zellen in %

	ATG 1202		MoAk 9G5		FITC-Kontrolle a-Kan.		a-Maus		Normal-IgG Kan.		Maus	
		n=		n=		n=		n=		n=		n=
Neugeborene Hunde												
Thymus	79	1	50	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Milz	92	1	26	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Knochenmark	85	1	40	1	0	1	0	1	0	1	0	1
Erwachsene Hunde												
Blut	84	1	64(7)	7	0	1	0(1)	7	0	1	1(1)	7
Knochenmark	15	1	37(17)	11	0	1	1(2)	11	0	1	1(1)	8
Blut												
NADC	87	1	81(11)	2	0	1	0	2	0	1	0	2
ADC	11	1	24(1)	2	0	1	0	2	0	1	0	2
Knochenmark												
NADC	-		58(21)	2	-		0	2	-		0	2
ADC	-		74(3)	2	-		0	2	-		0	2

NADC = nichtadhärente Zellen
ADC = adhärente Zellen
Antikörperverdünnung, log 2 :

Zweitantikörper (ATG 1202)= FITC-Ziege-anti-Kanichen
Zweitantikörper (MoAk 9G5)= FITC-Ziege-anti-Maus
ATG 1202 - 7, FITC-Ziege-anti-Kaninchen - 2
MoAk 9G5 - 5, FITC-Ziege-anti-Maus - 2

2.2.2. Immunfluoreszenz

ATG 1202 reagierte mit einem großen Teil der nicht adhärenten und auch mit einem Teil der adhärenten Blutzellen. Es erkannte somit nicht nur die T-Zellen der nicht-adhärenten Fraktion, sondern auch Zellen in der adhärenten Fraktion.
MoAk 9G5-positive Blut-Zellen waren fast alle nicht adhärent. Im Knochenmark markierte MoAk 9G5 hohe Anteile adhärenter und nicht adhärenter Zellen.

2.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der hohe Gehalt ATG 1202-positiver Zellen in T-Zell-reichen Zellsuspensionen aus Thymus oder nicht adhärenten Blutzellen belegte die T-Zell-Spezifität dieses Antiserums. Die große Zahl ATG 1202-positiver Milzund Knochenmarkzellen neugeborener Welpen wies darauf hin, daß im ATG 1202 noch relativ viele Antikörper enthalten waren, die mit anderen Zellen als T-Zellen reagierten bzw. kreuzreagierten und deren Anteil so hoch war, daß die Reaktion auch stattfinden konnte, wenn das Antiserum in einer log 2-Verdünnung von 7 verwendet wurde.
Die Reaktivität des MoAk 9G5 in Zellsuspensionen aus Organen neugeborener Welpen konnte ebenfalls als T-Zell-spezifisch gewertet werden, obwohl die Ergebnisse dieser Versuche nicht mit den von Mysliwietz et al. (1987) ermittelten Ergebnissen übereinstimmten. Diese Unterschiede konnten dadurch bedingt sein, daß andere Nachweismethoden verwendet wurden und daß die Zellen bis zum nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Wie in früheren Versuchen nachgewiesen wurde, sind Thymuszellen besonders empfindlich. Sie reagierten in der Immunfluoreszenz nur noch schwach. Knochenmarkzellen reagierten in Immunfluoreszenz und Rosettierung jedoch stärker, als in der von Mysliwietz et al. verwendeten Immunoperoxidasefärbung. Für diese Differenz waren zwei Erklärungsmöglichkeiten denkbar. Der MoAk 9G5 wurde für die hier gezeigten Versuche nicht ultrazentrifugiert. Antikörperaggregate konnten so über FC-Rezeptoren falsch positive Reaktionen

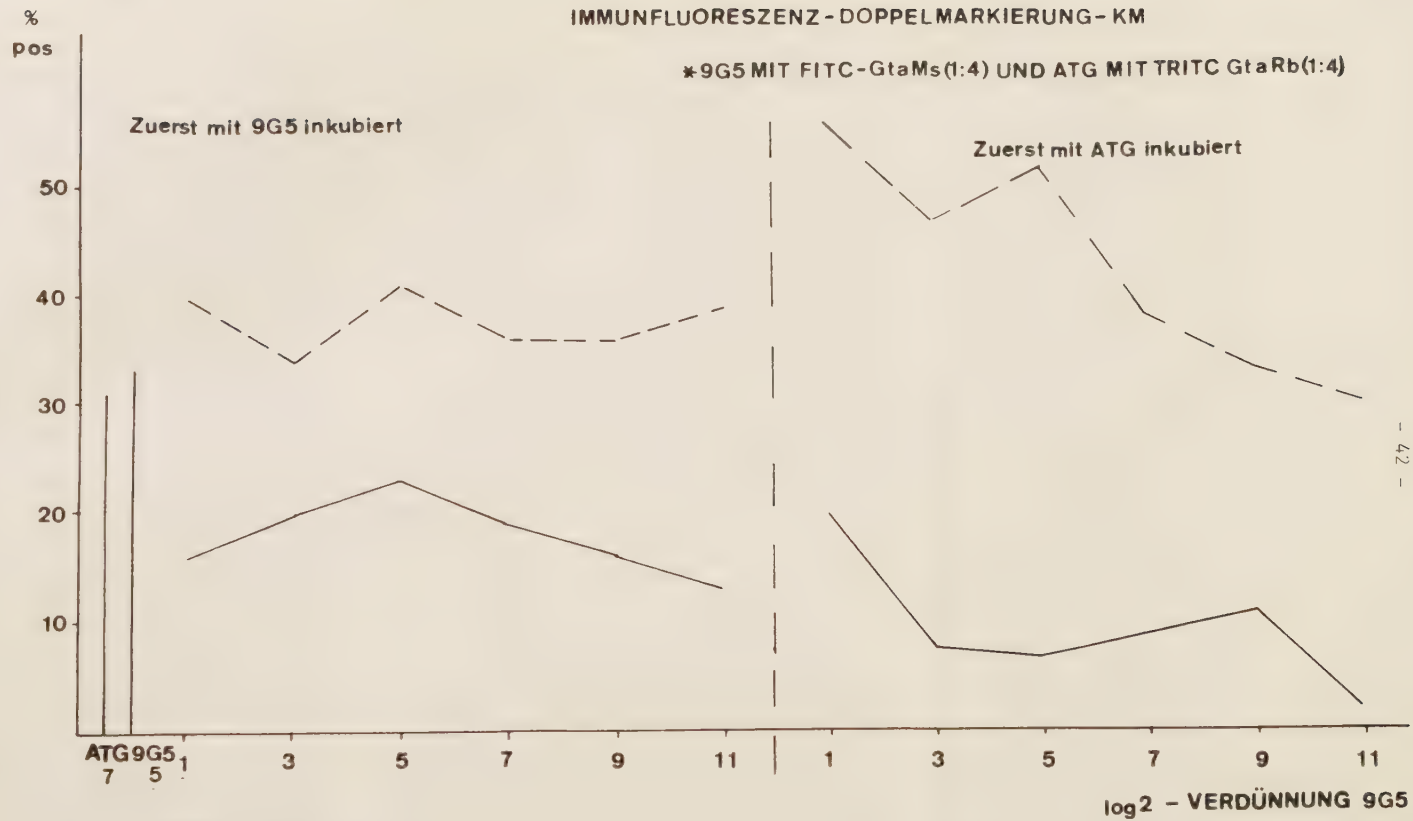
hervorrufen. Andererseits fixierten Mysliwietz et al. (1987) die Zellen, bevor sie mit Antikörper inkubiert wurden, so daß fixierungsempfindliche Antigene eventuell geschädigt waren. Der MoAk 9G5 erkannte jedoch auch eine relativ große Zahl adhärenter Knochenmarkzellen, so daß eine Reaktivität des MoAk 9G5 mit anderen Zellen als T-Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte.

3.Immunfluoreszenz/Doppelfluoreszenz

An mononukleären Knochenmarkzellen wurde eine Doppelmarkierung mit ATG 1202 und MoAk 9G5 durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde zuerst mit ATG 1202 inkubiert (30 Minuten bei 4°C) und daraufhin, nach mehrmaligem Waschen, mit MoAK 9G5 (30 Minuten bei 4°C). Beim anderen Teil der Zellen wurde umgekehrt verfahren. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte mit FITC-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG, um gebundenen MoAk 9G5 nachzuweisen, und mit Rhodamin-markiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG, um gebundenes ATG 1202 nachzuweisen.
Alle von MoAk 9G5 erkannten Zellen reagierten auch mit ATG 1202. Darüber hinaus markierte ATG 1202 auch 9G5-negative Zellen. Die Bindung des MoAk 9G5 an das von ihm erkannte Antigen wurde durch die Vorinkubation mit ATG 1202 gehemmt. Ein solche Hemmung war jedoch auch im umgekehrten Fall zu sehen.

Polyklonale Antiseren können eine Vielzahl von Antikörpern enthalten, die unterschiedliche Epitope eines Antigens erkennen, während monoklonale Antikörper nur in der Lage sind, ein Epitop dieses Antigens zu markieren.
Eine gegenseitige Beeinflussung zweier Antikörper in ihrer Bindung an das Antigen kann einerseits Ausdruck einer Konkurrenz um dasselbe Epitop sein. Andererseits können sterische Veränderungen des Antigens durch die Bindung eines Antikörpers die Bindung anderer Antikörper an dieses Antigen hemmen.

ABB. 5


%
pos
IMMUNFLUORESZENZ - DOPPELMARKIERUNG - KM
*9G5 MIT FITC-GtaMs(1:4) UND ATG MIT TRITC GtaRb(1:4)
Zuerst mit 9G5 inkubiert
Zuerst mit ATG inkubiert
50
40
30
20
10
ATG 7
9G5 5
1
3
5
7
9
11
1
3
5
7
9
11
log2 – VERDÜNNUNG 9G5
– – – = ATG pos. Zellen
——— = ATG+ 9G5 pos. Zellen
Keine ausschließlich 9G5 pos. Zellen

Die gegenseitige Hemmung von ATG 1202 und MoAk 9G5 in ihrer Bindung an Oberflächenantigene war ein Nachweis für die Erkennung desselben Antigens. Sie konnte durch beide genannten Mechanismen verursacht werden.

B) Separation der rosettierten Zellsuspension über Percoll

Zur Separation der mit Antikörper rosettierten T-Zellen aus einer Zellsuspension wurde die Zentrifugation über einen Dichtegradienten (Percoll) gewählt. Durch die Separation der rosettierten Zellsuspension erfolgte eine Trennung in Interphase und Bodensatz. Als Ausgangssuspension (AS) wird im folgenden die, mit Antikörper und daraufhin mit SPA-beschichteten Schaferythrozyten inkubierte und resuspendierte Zellsuspension benannt. Die Interphase stellt die Zellpopulation dar, die sich aufgrund ihrer geringen Dichte oberhalb des Gradientenmediums ablagerte; als Bodensatz wird das Zellsediment bezeichnet, das sich aufgrund seiner hohen Dichte durch die Zentrifugation unterhalb des Gradientenmediums absetzte. Interphase und Bodensatz wurden zur Zählung der Rosetten suspendiert, aber nicht gewaschen, um eine Zerstörung von Rosetten durch die Zentrifugation zu vermeiden.

1. Separation ATG 1202-rosettierter Knochenmarkzellen

Die Versuche zur Separation rosettierter Zellsuspensionen wurden zunächst mit ATG 1202 durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt der monoklonale Antikörper 9G5 noch nicht zur Verfügung stand. Die verwendeten Zellsuspensionen wurden durch Separation über Ficoll (1,077 g/ml) aus Blut und Knochenmark erwachsener Hunde gewonnen.

1.1. Untersuchungen über den Einfluß der Separationsbedingungen auf die Rosettendepletion

Um eine möglichst gute Separation zu gewährleisten, wurden die drei Parameter: Dichte des verwendeten Gradienten, Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit variiert und die günstigste Konstellation ermittelt.

1.1. 1. Ermittlung der benötigten Percoll-Dichte

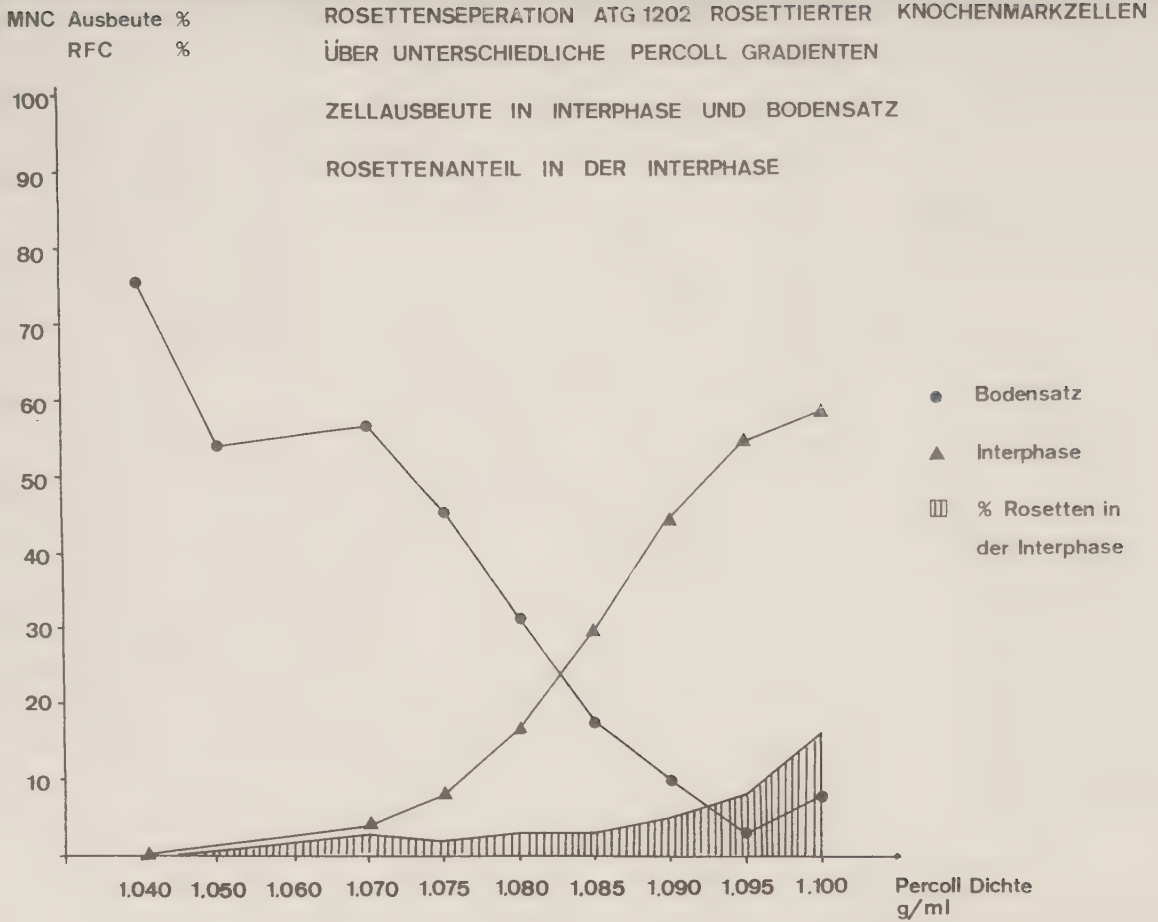
Ziel der Versuche war, die Percoll-Dichte zu ermitteln, bei der eine weitestgehende Trennung rosettierter und nicht rosettierter Zellen gelingt. Die Zellsuspensionen wurden bei 1800 RPM (entspricht 500g) 15 Minuten separiert.In Tabelle 2 ist dargestellt, wie hoch der Anteil rosettierter Zellen in den Suspensionen vor (Ausgangssuspension) und nach Separation (Interphase und Bodensatz) war. Der Anteil rosettierter Zellen in der Interphase schwankte stark, ohne daß ein deutlicher Zusammenhang zwischen diesem Anteil und der verwendeten Percoll-Dichte zu sehen war. Lag die Percoll-Dichte unter 1,070 g/ml, wurden zunehmend nicht rosettierte Zellen aus der Interphase entfernt, und der Anteil nicht rosettierter Zellen im Bodensatz stieg an. Die weitere Eingrenzung eines Dichtebereichs war durch die Bestimmung des Rosettenanteils allein nicht möglich.

Tab. 2) Rosettenseparation mit verschiedenen Percoll-Dichtegradienten, % RFC in Ausgangssuspension, Interphase und Bodensatz

Percoll-Dichte	mononukleäre Zellen aus Knochenmark			mononukleäre Zellen aus Blut		
	AS	I	B	AS	I	B
1,100	21%	77%	89%	44%	88%	94%
	18%	16%	25%			
1,095	23%	8%	30%			
1,090	21%	71%	93%	74%	74%	90%
	55%	56%	85%	92%	64%	87%
	55%	70%	82%	81%	79%	100%
	15%	5%	37%	44%	90%	84%
1,085	55%	30%	84%	92%	1%	96%
	55%	58%	95%			
	24%	3%	79%			
1,080	21%	7%	91%			
	13%	3%	61%			
	55%	34%	80%			
	55%	44%	88%			
1,077	21%	9%	93%			
1,075	55%	30%	82%			
	20%	2%	61%			
1,070	18%	3%	66%			
1,050	19%	-	28%			
1,040	17%	-	19%			

AS = Ausgangssuspension
I = Interphase
B = Bodensatz

Im nächsten Schritt wurde die Zellausbeute in der Interphase zur Bestimmung der besten Percoll-Dichte mit herangezogen, um den Verlust nicht rosettierter Zellen möglichst gering zu halten. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Bei geringer Percoll-Dichte waren nach der Separation nur noch wenige Zellen in der Interphase. Im Dichtebereich zwischen 1,075 und 1,090 g/ml stieg die Zahl der MNC in der Interphase deutlich an, während sie im Bodensatz abnahm. Der Anteil rosettierter Zellen in der Interphase blieb in diesem Bereich nahezu konstant.


MNC Ausbeute %
RFC %
ROSETTENSEPERATION ATG 1202 ROSETTIERTER KNOCHENMARKZELLEN
ÜBER UNTERSCHIEDLICHE PERCOLL GRADIENTEN
ZELLAUSBEUTE IN INTERPHASE UND BODENSATZ
ROSETTENANTEIL IN DER INTERPHASE
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
Bodensatz
Interphase
% Rosetten in der Interphase
1.040
1.050
1.060
1.070
1.075
1.080
1.085
1.090
1.095
1.100
Percoll Dichte g/ml

Durch die Separation nicht rosettierter Zellen über Percoll (Tabelle 3) konnte dieser Bereich noch weiter eingegrenzt werden. Der Verlust mononukleärer Zellen aus der Interphase sank mit steigender Percoll-Dichte kontinuierlich und erreichte bei einer Dichte von 1,085 akzeptable Werte. Die Percoll-Dichte 1,090 führte zwar ebenfalls zu einem geringen Verlust nicht rosettierter Zellen aus der Interphase, jedoch auch zu einer schlechteren Separation rosettierter Zellen (Tabelle 2), so daß für die weiteren Versuche die Percoll-Dichte 1,085 g/ml beibehalten wurde.

Tab. 3) Separation nicht rosettierter Knochenmarkzellen über verschiedene Percoll-Gradienten, Zellausbeute in % der eingesetzten MNC

Percoll-Dichte	Zellausbeute Interphase	Zellausbeute Bodensatz	Zellausbeute gesamt
1,075 g/l	28%	26%	54%
1,080 g/l	52%	14%	66%
1,085 g/l	67%	6%	73%
1,090 g/l	65%	1%	66%

1.1.2. Ermittlung der besten Zentrifugationszeit und Zentrifugationsgeschwindigkeit

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, wie Geschwindigkeit und Dauer der Zentrifugation die Abtrennung rosettierter Zellen über einen Percoll-Dichtegradienten beeinflußten. Zu diesem Zweck wurden mononukleäre Zellen aus Blut und Knochenmark mit ATG 1202 in einer log 2-Verdünnung von 7 und SPA-SRBC rosettiert und über Percoll der Dichte

1,085 g/ml separiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt. Es wurden zwei Zentrifugationsgeschwindigkeiten und drei Zentrifugationszeiten getestet. Dabei konnte durch Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit von 1800 RPM (entspricht einer Zentripetalbeschleunigung von 500g) auf 2700 RPM (entspricht einer Zentripetalbeschleunigung von 1000g) eine Verminderung des Rosettenanteils der mononukleären Zellen in der Interphase von 45% RFC auf 24% RFC erzielt werden. Die Verlängerung der Zentrifugationszeit von 15 Minuten auf 30 Minuten wirkte sich jedoch nur in einer weiteren 1%igen Senkung des RFC-Anteils aus. Eine völlige Entfernung der Rosetten aus der gemischten Ausgangssuspension durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten war nicht möglich.

Tab. 4) Rosettierung in Ausgangssuspension, Interphase und Bodensatz nach Percoll-Separation mit unterschiedlichen Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten

MNC	RPM	Minuten	% RFC in der Ausgangss.	% RFC in der Interphase	% RFC im Bodensatz
KM	1800	15	45%	45%	90%
KM	1800	20	45%	34%	83%
KM	1800	30	45%	32%	93%
KM	2700	15	21%	28%	63%
KM	2700	15	27%	19%	74%
KM	2700	15	30%	20%	73%
KM	2700	15	20%	21%	72%
KM	2700	30	21%	24%	86%
KM	2700	30	27%	25%	87%
KM	2700	30	20%	21%	70%
PBL	2700	15	60%	2%	95%
PBL	2700	30	60%	2%	97%

1.1.3. Nachweis der CFU_{GM} nach Separation mononukleärer Knochenmarkzellen über Percoll der Dichte 1,085 g/ml

Die Separation der rosettierten Zellen über Percoll der Dichte 1,085 war nur dann sinnvoll, wenn nicht rosettierte Stamm- und Vorläuferzellen nicht ebenfalls sedimentierten. Ficoll-separierte Knochenmarkzellen zweier Hunde wurden über Percoll 1,085 separiert und aus Interphase und Bodensatz CFU_{GM}-Kulturen angesetzt. In beiden Fällen sedimentierten nur wenige der nachgewiesenen Vorläuferzellen.

Tab. 5) CFU_{GM} in Interphase und Bodensatz aus Percoll-separierten Knochenmarkzellen, Mittelwerte aus Triplets

Hund Nr.		N 967	N 990
Zellausbeute Interphase		32%	39%
Zellausbeute Bodensatz		4%	3%
CFU_{GM}/100 000 MNC			
MNC der Interphase	MW	133	261
	SD	11	20
MNC des Bodensatzes	MW	0	13
	SD	0	4

1.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Als beste Percoll-Dichte konnte die Dichte 1,085 g/ml, als beste Zentrifugationszeit 20 Minuten und als beste Zentrifugationsgeschwindigkeit 2700 RPM (das entspricht einer Zentripetalbeschleunigung von 1000g) festgelegt werden.

2. Rosettierung mit Rindererythrozyten

Die Erythrozyten des Rindes sind deutlich grösser (MCV 52 fl), als die des Schafes (MCV 33 fl), bei gleicher Hämoglobinkonzentration (MCHC 33 g/dl). Eine Rosettenseparation mit SPA-BRBC anstelle von SPA-SRBC könnte zu besseren Separationsergebnissen führen.
Die Rosettenbildung der SPA-beschichteten Rindererythrozyten mit mononukleären Zellen aus Knochenmark war relativ hoch. Tatsächlich konnte bei Verwendung von Knochenmarkzellen der RFC-Anteil der Interphase von durchschnittlich 19% (mit Schaferythrozyten) auf durchschnittlich 6% gesenkt werden. Die angestrebte Verminderung des rosettierten Anteils der mononukleären Zellen in der Interphase nach Separation auf unter 1% war jedoch nicht möglich.

Tab. 6) Rosettenseparation mit ATG 1202 und SPA-beschichteten Rindererythrozyten im Vergleich zur Rosettenseparation mit ATG 1202 und SPA-beschichteten Schaferythrozyten, Rosettenanteil der Einzelfraktionen in % RFC

Erythrozyten	% RFC in der Ausgangssusp.		% RFC in der Interphase		% RFC im Bodensatz	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SRBC n = 11	32%	(11)	19%	(11)	77%	(16)
BRBC n = 4	51%	(7)	6%	(6)	93%	(3)

SRBC = Schaferythrozyten
BRBC = Rindererythrozyten

3. Untersuchungen zum Einfluß von Waschmedium und Vorinkubation auf die Rosettenbildung und -separation

In den vorangegangenen Versuchen war es nicht gelungen, die ATG 1202-vermittelten Rosetten durch Änderung der Zentrifugationsgeschwindigkeit, Zentrifugationszeit oder der Percoll-Dichte vollständig aus der Interphase zu entfernen. Dies wurde dadurch erklärt, daß instabile Rosetten sich durch das Resuspendieren vor der Percoll-Separation aufgelöst hatten und im Verlauf der Separation rekombinierten. Die Bildung instabiler Rosetten ist durch rein physikalische Anlagerung von Antikörpern an die Zelloberfläche, durch die Bindung von Antikörperaggregaten bzw. Immunkomplexen an FC-Rezeptoren oder auch über die Bindung schwach affiner Antikörper an zelluläre Antigene möglich.
Eine Möglichkeit, die Bildung von Rosetten während der Separation zu überprüfen, ist die Berechnung der Rosettenausbeute, d. h. der Vergleich der absoluten Rosettenzahl vor der Separation (in der Ausgangssuspension) mit der absoluten Rosettenzahl nach der Separation (in Interphase und Bodensatz). Die Rosettenausbeute wurde als Vielfaches der vor der Separation in der resuspendierten Ausgangssuspension vorhandenen Rosetten ausgedrückt.
Da die Rosetten der Ausgangssuspension nach dem Resuspendieren gezählt wurden, repräsentiert dieser Rosettenwert den Anteil relativ stabiler Rosetten.
Die Rosettenausbeute wurde unter Zuhilfenahme der Zellausbeute berechnet.
Die Ergebnisse der Separationsversuche mit ATG 1202 sind Tabelle 6 zu entnehmen, in der der Anteil rosettierter Zellen in Ausgangsuspension, Interphase und Bodensatz als % RFC, die Ausbeute mononukleärer Zellen in den einzelnen Fraktionen als % der zur Separation eingesetzten Zellen (= Ausgangssuspension) und die Rosettenausbeute als Vielfaches der zur Separation eingesetzten Rosetten (absolute Rosettenzahl der Ausgangssuspension) dargestellt ist.

Rosettierung und Rosettenseparation mit ATG 1202 und Kaninchen-Normal-IgG im Vergleich

Das Antithymozytenglobulin ATG 1202 wurde aus dem Serum immunisierter Kaninchen hergestellt. Durch den Vergleich des ATG 1202 mit Kaninchen-Normalserum wurde überprüft, ob eine unspezifische Rosettenbildung durch Antikörper im Kaninchenserum verursacht werden konnte. Rosettierung und Separation der Rosetten ist in Tabelle 7 dargestellt. Nach Inkubation mit Kaninchen-Normalserum bildeten sich durchschnittlich nur 5% Rosetten. Das entsprach der Rosettierung ohne Antikörper (spontan). Durch die Separation über Percoll konnten sowohl die Rosetten nach Kaninchenserum-Inkubation als auch die Spontanrosetten aus der Interphase entfernt werden.

3.1. Waschmedium

Zunächst wurde versucht, durch die Verwendung anderer Waschmedien die Bildung instabiler Rosetten zu verhindern. In den vorhergehenden Versuchen war Hanks mit 0,1% BSA als Waschmedium verwendet worden.

3.1.1. Hanks ohne BSA als Waschmedium

Das verwendete BSA enthält 1 bis 4% Globulin. Im BSA enthaltene Antikörper-Aggregate konnten durch ihre Bindung an FC-Rezeptoren die Bildung instabiler Rosetten verursacht haben. Deshalb wurde dem Waschmedium Hanks in diesem Versuch kein BSA zugesetzt. Die Rosetten der Ausgangssuspension nach dem Resuspendieren repräsentieren den Anteil relativ stabiler Rosetten, der ohne BSA im Waschmedium nicht vermindert war. Die Rosetten vermehrten sich jedoch im Verlauf der Separation erheblich. Als Ursache für diese Rosettenbildung während der Separation kam somit das BSA nicht in Betracht. Die Entfernung aller Rosetten aus der Interphase gelang in diesem Versuch nicht, und ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Rosettenbildung während der Separation und deren

Verbleiben in der Interphase war nicht auszuschließen.

3.1.2. Ca/Mg-freies Hanks als Waschmedium

Die Adhärenz von Zellen an Oberflächen ist meist Ca/Mg-abhängig. Die Bildung instabiler Rosetten konnte durch Adhärenzphänomene mitverursacht worden sein. Um dies auszuschließen, wurde Ca/Mg-freies Waschmedium verwendet. Die Rosettierung der Ausgangssuspension war auch hier nicht vermindert. Eine deutliche Rosettenvermehrung war nicht festzustellen, so daß sich in diesem Versuch Rosettenbildung und -auflösung die Waage hielten. Die Rosettenbildung während der Separation war somit weniger ausgeprägt, als in den vorangegangenen Versuchen. Eine vollständige Entfernung der Rosetten aus der Interphase war auch mit Ca/Mg-freiem Waschmedium nicht möglich, der Anteil rosettierte Zellen in der Interphase war jedoch vermindert.

3.1.3. Hanks mit 20% autologem Serum als Waschmedium

Dem Waschmedium wurde autologes Serum zugesetzt, um FC-Rezeptoren der Knochenmarkzellen durch die im autologen Serum vorhandenen Antikörper abzudecken. Die Bildung instabiler Rosetten über FC-Rezeptoren konnte durch im ATG 1202 enthaltene Komplexe aus Antikörpern und Antigen verursacht worden sein. Solche Komplexe bestehen in der Regel aus mehreren Antikörpern + Antigen, wobei sich ein Antikörper über seinen konstanten Bereich (FC-Teil) an den FC-Rezeptor bindet; weitere Antikörper, die über die Bindung an das Antigen am Komplex haften, über ihren freiliegenden FC-Teil könnten die Bindung an die SPA-beschichteten Schaferythrozyten vermitteln. Freie Antikörper aus dem autologen Serum, die sich mit ihrem FC-Teil an FC-Rezeptoren gebunden haben, können keine Bindung mit dem an die Schaferythrozyten gekoppelten SPA mehr eingehen, da das SPA sich ebenfalls spezifisch an den FC-Teil des Antikörpers bindet. Durch den Zusatz autologen Serums war die Bildung von Rosetten in der Ausgangsuspension

vermindert. Die Rosetten vermehrten sich im Verlauf der Separation in allen Versuchen mit 20% autologem Serum im Waschmedium stark. Dennoch waren mit dieser Methode weit bessere Separationsergebnisse zu erzielen, als mit Hanks mit BSA als Waschmedium.

3.2. Vorinkubation

Die Knochenmarkzellen wurden für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Die Vorinkubation mit Medium diente der Ablösung unspezifisch an der Zelloberfläche haftender Antikörper, die Vorinkubation mit Serum (autologes Serum bzw. fötales Kälberserum) der Abdeckung von FC-Rezeptoren.

3.2.1. Vorinkubation in Hanks

Die Vorinkubation in Medium ohne proteinhaltige Zusätze wurde vorgenommen, um locker an die Zellmembran angelagerte Antikörper abzulösen. Diese Ablösung angelagerter Antikörper würde sich, falls diese Antikörper stabile Rosetten bilden, in einer verminderten Rosettierung der Ausgangsuspension, falls diese Antikörper instabile Rosetten bilden, auch in einer verbesserten Separation oder einer geringeren Rosettenvermehrung äussern. In der Ausgangssuspension rosettierten jedoch erheblich mehr Knochenmarkzellen, als ohne Vorinkubation. Die erhöhte Rosettierung der Ausgangssuspension war mit einer Verschlechterung der Separationsergebnisse und mit einem hohen Rosettenverlust verbunden. Diese vermehrten ATG 1202-Rosetten konnten zwar resuspendiert werden, ohne sich aufzulösen, nicht jedoch über Percoll abgetrennt werden.

3.2.2. Vorinkubation in autologem Serum

Die Vorinkubation in autologem Serum wurde vorgenommen, um FC-Rezeptoren abzudecken.
Nach Vorinkubation in autologem Serum bildeten sich, wie nach Vorinkubation in Hanks, wesentlich mehr Rosetten in der Ausgangssuspension als ohne Vorinkubation. Diese Rosetten gingen im Verlauf der Separation zum großen Teil verloren. Eine vollständige Depletion der Rosetten war nicht möglich. Durch die Vorinkubation in autologem Serum konnte die Bildung instabiler Rosetten nicht verhindert werden.

3.2.3. Vorinkubation in FCS (Fötales Kälberserum)

Die Vorinkubation in FCS wurde, wie die Vorinkubation in autologem Serum, vorgenommen, um FC-Rezeptoren abzudecken. Sie führte, ebenso wie die Vorinkubation mit autologem Serum, zu einer verstärkten Rosettenbildung in der Ausgangssuspension, einem hohen Rosettenverlust und zu einer schlechten Abtrennung rosettierter Zellen aus der Interphase.

3.2.4. Vorinkubation in IgG-freiem FCS

Die Beteiligung von Immunkomplexen und/oder Antikörperaggregaten aus dem Vorinkubationsmedium (autologes Serum, FCS) an der Bildung instabiler Rosetten konnte nicht ausgeschlossen werden. Durch die Inkubation mit IgG-freiem FCS wurde dies überprüft. Die Rosettierung der Ausgangssuspension war nach Vorinkubation in IgG-freiem FCS stark vermindert. Die meisten Rosetten bildeten sich erst während der Separation und bewirkten eine erhebliche Rosettenvermehrung. Auch in diesen Versuchen konnten die Rosetten nicht vollständig aus der Interphase depletiert werden.

Tab. 7) Separation ATG 1202-rosettierter Knochenmarkzellen über Percoll (1.085)

Methode	% RFC in AS	I	B	RFC-Ausbeute Gesamt	I	B	% MNC-Ausbeute Gesamt	I	B
Spontan-	2%	0	17%	0,91	0	0,91	99%	88%	11%
Rosetten	5%	0	20%	0.89	0	0,89	40%	18%	22%
Kan.-NIgG									
1 : 8	3%	0	33%	1,97	0	1,97	78%	60%	18%
1 : 32	5%	0	17%	0,71	0	0,71	33%	12%	21%
1 :128	8%	0	17%	0,43	0	0,43	46%	26%	20%
W Hanks									
mit 0,1% BSA MW	32%	19%	77%	1,30	0,04	1,26	66%	9%	60%
n = 11 SD	(11)	(11)	(16)	(0.72)	(0,03)	(0,72)	(14)	(8)	(22)
W ohne BSA	34%	15%	64%	1,90	0,04	1,86	102%	1%	101%
W Ca/Mg-frei	42%	6%	75%	1,07	0,002	1,068	61%	12%	49%
	27%	11%	73%	-	-	-	-	-	-
W 20% autolog.	10%	2%	71%	3,43	0,02	3,41	56%	8%	48%
Serum	21%	2%	49%	2,20	0,02	2,18	113%	21%	92%
	19%	4%	60%	1,76	0,06	1,70	85%	30%	55%
	23%	1%	50%	2,04	0,01	2,03	105%	19%	86%
	23%	2%	71%	3,24	0,03	3,21	155%	6%	149%
V Hanks	56%	38%	97%	0,60	0,03	0,57	37%	5%	32%
	88%	66%	99%	0,17	0,02	0,15	16%	3%	13%
	82%	38%	89%	0,18	0,01	0,17	17%	1%	16%
V autologem	60%	40%	98%	0,30	0,07	0,23	24%	10%	14%
Serum	78%	67%	99%	0,26	0,004	0,256	21%	1%	20%
	78%	53%	99%	0,25	0,03	0,22	22%	5%	17%
V FCS	50%	45%	96%	0,74	0,09	0,65	44%	10%	34%
	87%	73%	93%	0,14	0,04	0,10	14%	5%	9%
	73%	47%	94%	0,09	0,02	0,07	8%	3%	5%
V IgG-freiem	25%	28%	73%	2,85	0,02	2,65	98%	1%	98%
FCS	5%	12%	64%	9,12	0,12	9,00	80%	6%	74%

V = Vorinkubation in ..., AS = Ausgangssuspension, I = Interphase,

W = Waschmedium mit ..., B = Bodensatz,

RFC = Rosette Forming Cells

MNC = Mononuclear Cells

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

ATG 1202-vermittelte Rosetten konnten nicht durch Dichtegradientenzentrifugation aus der rosettierten Zellsuspension depletiert werden. Eine Bildung instabiler Rosetten, die sich während der Separation auflösen und rekombinieren, oder sich während der Separation neu bilden, wurde für diese Tatsache verantwortlich gemacht. Die Verwendung von Rindererythrozyten zur Rosettierung verbesserte die Separation nicht ausreichend. Kalzium/Magnesium abhängige Adhärenzvorgänge waren der Bildung instabiler Rosetten beteiligt, jedoch nicht alleinige Ursache. Eine Beteiligung von FC-Rezeptoren an dieser Rosettenbildung konnte durch die vorgenommenen Versuche nicht ausgeschlossen werden. Antikörper-Aggregate und Immunkomplexe, die eine FC-Rezeptor-abhängige Rosettierung vermittelten, konnten sowohl dem Waschmedium (BSA, autologes Serum), als auch dem Vorinkubationsmedium (autologes Serum, FCS) und vor allem dem Antiserum selbst entstammen. Bovine Immunglobuline binden sich schlecht an SPA, so daß eine erhebliche Rosettenbildung nicht auf BSA- oder FCS-Bestandteile zurückgeführt wurde. Der Zusatz autologen Serums zum Waschmedium verminderte die Rosettenbildung in der Ausgangssuspension erheblich und verbesserte die Separation. Autologe Immunglobuline waren in der Lage, FC-Rezeptoren abzudecken und die FC-Rezeptor-vermittelte Rosettierung zu vermindern. Während der Separation vermehrten sich die Rosetten jedoch stark. Die Bindung autologer Antikörper an FC-Rezeptoren löste sich demnach während der Separation. Durch Vorinkubation in Serum konnten FC-Rezeptoren nicht dauerhaft abgedeckt werden. Die Ablösung der Antikörper von den FC-Rezeptoren erfolgte hier schon währen das Vorinkubationsmedium ausgewaschen wurde, so daß Antikörper-Aggregate und Immunkomplexe aus dem ATG 1202 stärker zur Rosettierung beitragen konnten. Die Abdeckung von FC-Rezeptoren und/oder Antigenen durch Faktoren aus dem IgG-freien FCS konnte nicht geklärt werden. Die Auflösung

und Neubildung von Rosetten während der Separation ist dann möglich, wenn die Bindung von Antikörpern, Antikörper-Aggregaten oder Immunkomplexen an Antigene bzw. FC-Rezeptoren der Zellmembran zu schwach ist, um den während der Zentrifugation auftretenden Scherkräften zu widerstehen. Die Bindungsstärke schwach affiner Antikörper zum Antigen ist gering, so daß ein hoher Anteil schwach affiner Antikörper im ATG 1202 erheblich zur Bildung instabiler Rosetten beigetragen haben konnte.

4. Separation ATG 1202-rosettierter Blutzellen

Die Ergebnisse der Separation ATG 1202-rosettierter Blutzellen sind in Tabelle 8 dargestellt. Sie gelang wesentlich besser als die Separation mononukleärer Knochenmarkzellen. Die ausgereiften T-Zellen im peripheren Blut bildeten zum größeren Teil stabile, separierbare Rosetten. Dies konnte durch eine relativ einheitlich hohe Antigendichte der Blut-T-Zellen oder auch durch eine geringere Beteiligung von FC-Rezeptoren an der Rosettenbildung bedingt sein.

Tab. 8) Rosettierung mit ATG 1202 in Blut und Knochenmark und Separation der Rosetten über einen Percoll-Gradienten (1,085)

	Rosettierung in %					
	Blut (n = 5)			Knochenmark (n = 11)		
	AS	I	B	AS	I	B
MW	67%	5%	91%	32%	19%	77%
SD	16	5	12	11	11	16

AS = Ausgangssuspension, I = Interphase, B = Bodensatz

5. Separation MoAk 9G5-rosettierter Knochenmarkzellen

Nachdem die Separation der ATG 1202-Rosetten nicht gelungen war, wurde nun der monoklonale Antikörper 9G5 zur Rosettierung und Rosettenseparation eingesetzt. Der monoklonale Antikörper 9G5 ist ein Maus-anti-Hunde-T-Zell-Antikörper der Klasse IgG 2b. Immunglobuline der Maus binden sich relativ schlecht an SPA (Richman et al. 1982), so daß für diese Versuche die Schaferythrozyten mit einer höheren SPA-Konzentration beschichtet werden mußten (4 mg/ml SPA statt 1 mg/ml SPA).

5.1. Rosettierung größerer Zellmengen

Zur Separation der rosettierten Zellen aus einer mit MoAk 9G5 rosettierten Ausgangssuspension wurden größere Zellmengen (mindestens $10x10^6$ MNC) benötigt. Die Rosettierung dieser Suspensionen war mit durchschnittlich 18% jedoch deutlich schlechter als die der 50/ul Vergleichsprobe mit 28%, die im üblichen Rosettentest verwendet wurde (Tabelle 9).
Als Ursache für die schlechtere Rosettierung wurde ein unzureichender Antigen-Antikörperkontakt bzw. ein unzureichender Kontakt zwischen antikörperbeschichteten T-Zellen und SPA-beschichteten Erythrozyten angenommen.

5.1.1. Verlängerung der Inkubationszeit

Um den Zell-Erythrozyten-Kontakt zu verbessern, wurde die Inkubationszeit der Antikörper-beschichteten mononukleären Zellen mit SPA-SRBC von einer Stunde auf 12 - 14 Stunden (übernacht) verlängert. Die Rosettierung grösserer Zellmengen im Vergleich zur 50 /ul-Probe ist in Tabelle 9, die Separation rosettierter Zellsuspensionen mit verlängerter Inkubationszeit in Tabelle 11 dargestellt. Die Rosettenbildung wurde durch die Verlängerung der Inkubationszeit nicht erhöht. Eine Schädigung der proliferationsfähigen Zellen konnte nicht ausgeschlossen werden.

Tab. 9) Rosettierung unterschiedlicher Zellmengen

	% RFC in 50/ul (5×10^6 MNC/ml)		% RFC in 2 - 10 ml (5×10^6 MNC/ml)	
	MW	SD	MW	SD
Inkubation 1 Std., ohne Schütteln	28% n = 12	(13)	18% n = 11	(13)
Inkubation 12-14 Std. ohne Schütt.	23% n = 3	(8)	18% n = 3	(3)
Inkubation 1 Std., mit Schütteln	23% n = 5	(11)	33% n = 5	(20)

5.1.2. Rosettierung mit Zweitantikörper

Durch die Verwendung eines polyklonalen Zweitantikörpers wurde versucht, die Zahl auf der Zelloberfläche gebundener Antikörper zu erhöhen. Der Kaninchen-anti-Maus Antikörper reagierte sowohl mit dem, von der Maus stammenden, monoklonalen Antikörper 9G5, als auch mit den SPA-beschichteten Schaferythrozyten. Die Protein A-Bindungsstärke des Kaninchen-IgG ist deutlich höher als die des Maus-IgG (Richman et al. 1982), so daß als zusätzlicher Effekt eine stabilere Rosettenbildung erwartet wurde.

Um in dem, als Zweitantikörper verwendeten, Kaninchenglobulin Antikörper nachzuweisen, die direkt mit MNC des Hundes reagieren, wurde es als alleiniger Antikörper zur Rosettierung eingesetzt. Die Rosettenwerte entsprachen mit 13 -23% (n = 5) in etwa denen der Spontanrosettierung (21%).

Bestimmung der Zweitantikörper-Verdünnung

Mononukleäre Knochenmarkzellen wurden zuerst mit MoAk 9G5 (1 Stunde bei 4 °C) und daraufhin mit Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (30 Minuten bei Raumtemperatur) inkubiert. Die Rosettierung dieser doppelt Antikörper-beschichteten Zellen ist in Abbildung (7) dargestellt. Die besten Rosettierungsergebnisse wurden erzielt, wenn der Zweitantikörper 1 : 512 (das entspricht einer log 2-Verdünnung von 9) verdünnt wurde, wobei die Rosettierungsergebnisse in allen Fällen besser waren als mit MoAk 9G5 allein.

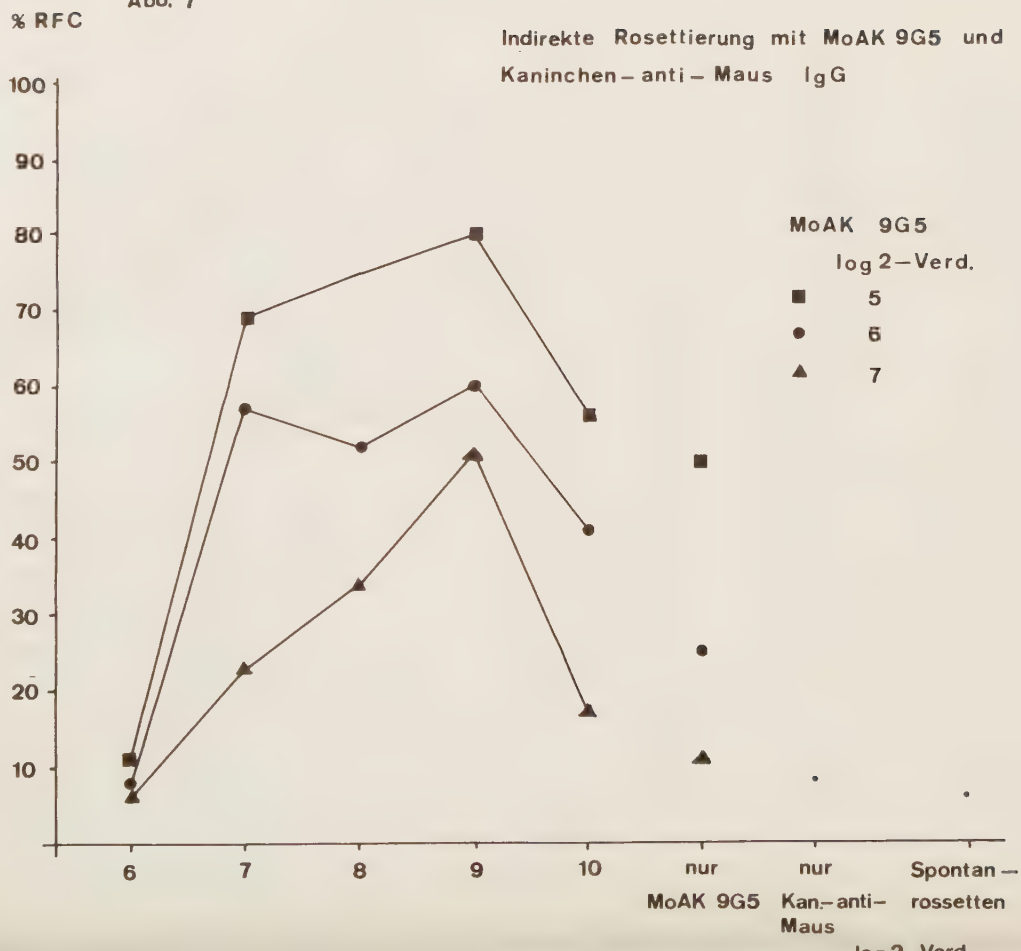
Zunächst wurde untersucht, ob durch Verwendung eines Zweitantikörpers die Rosettierung mit MoAk 9G5 in größeren Zellmengen verbessert werden konnte. Die Ergebnisse dieses Ansatzes sind in Tabelle (10) dargestellt.

Tab 10) Rosettierung in % RFC in Blut und Knochenmark bei Rosettierung unterschiedlicher Zellmengen mit MoAk 9G5 und Zweitantikörper

Zellmenge ($5x10^6$/ml)	PBL 9G5 1:32	PBL 9G5 1:32 KaM 1:512	KM 9G5 1:32	KM 9G5 1:32 KaM 1:512
0,05 ml	66%	70%	17%	16%
0,50 ml	63%	66%	23%	29%
1,00 ml	70%	77%	16%	30%
2,00 ml	39%	80%	19%	31%
4,00 ml	-	-	19%	24%

KaM = Kaninchen-anti-Maus-IgG
PBL = peripheres Blut
KM = Knochenmark

Abb. 7


% RFC
Indirekte Rosettierung mit MoAK 9G5 und
Kaninchen – anti – Maus IgG
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
MoAK 9G5
log 2 – Verd.
5
6
7
6
7
8
9
10
nur
MoAK 9G5
nur
Kan.–anti–
Maus
Spontan –
rossetten
log 2 Verd.

Die Rosettierung mit 9G5 und Zweitantikörper in größeren Zellmengen ($0.25x10^6$ bis $20x10^6$MNC) führte zu einer gleichbleibend höheren Rosettenbildung im Vergleich zur 9G5-SPA-SRBC-Rosettierung.

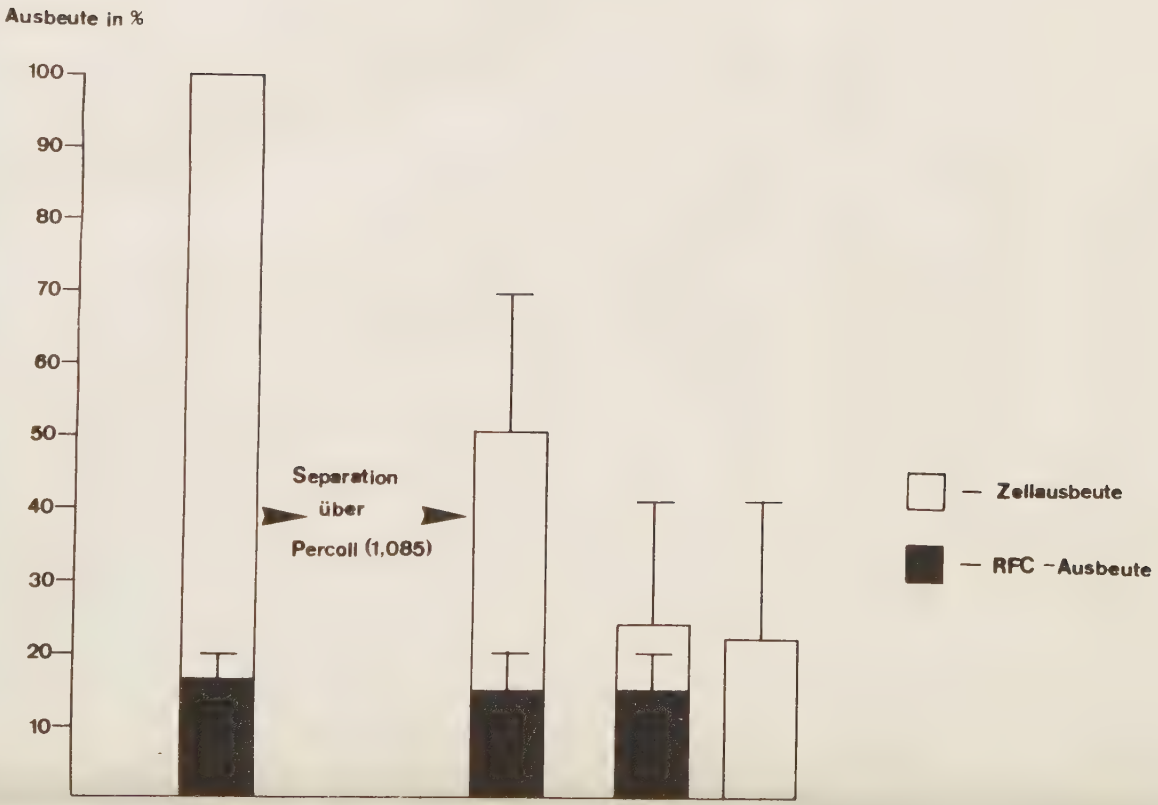
Die Separation der Zweit-Antikörper-Rosetten über Percoll (1,085) ist in Tabelle 11 dargestellt. Sie war nicht in allen Fällen vollständig. In einem Fall vermehrten sich die Rosetten während der Separation auf mehr als das Doppelte.

5.1.3. Rosettierung mit mehrmaligem Aufschütteln während der Inkubation

In der ersten Inkubation wurde die Suspension mononukleärer Knochenmarkzellen mit verdünntem Mo-Ak 9G5 eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Die mononukleären Knochenmarkzellen setzten sich dabei rasch ab und waren damit für den Antikörper nicht mehr frei zugänglich. Ein Schütteln innerhalb dieser Inkubationszeit sollte den Kontakt zwischen den gelösten Antikörpermolekülen und den Antigenen der Zelloberfläche verbessern. Die Zellsuspension wurde alle 10 Minuten geschüttelt. Tatsächlich konnte die Rosettierung der Knochenmarkzellen von durchschnittlich 18% ohne Schütteln auf durchschnittlich 32 % gesteigert werden.
Diese Methode wurde daraufhin für alle weiteren Versuche beibehalten.

Abb. 8

Separation MoAk 9G5 - rosettierten Knochenmarks



Tab. 11) Separation der MoAk 9G5-Rosetten über Percoll (1,085)

Methode	% RFC in			RFC-Ausbeute			% MNC-Ausbeute		
	AS	I	B	Gesamt	I	B	Gesamt	I	B
Ink.zeit 1Std.	10%	0,6%	84%	0,57			28%	21%	7%
ohne Schütteln	18%	0	82%	1,00	0	1,00	67%	45%	22%
	26%	0	60%	0,88	0	0,88	63%	25%	38%
	29%	0	75%	1,00	0	1,00	61%	22%	39%
	6%	0	50%	0,14	0	0,14	44%	42%	2%
Ink.zeit	15%	0	38%	1,05	0	1,05	74%	32%	42%
verlängert	18%	0	43%	1,00	0	1,00	54%	12%	42%
	21%	0	53%	0,71	0	0,71	40%	12%	28%
mit Zweit-	29%	6%	96%	2,08	0,1	2,07	93%	32%	61%
antikörper	10%	0	76%	1,10	0	1,10	49%	35%	14%
	18%	1%	50%	0,51	0,01	0,50	40%	22%	18%
Ink.zeit 1 Std.	16%	0	65%	0,42	0 0	0,42	38%	28%	10%
mit Schütteln	57%	0	62%	0,20	0	0,20	26%	8%	18%
	50%	0	52%	0,45	0	0,45	45%	2%	43%
	25%	0	34%	0,48	0	0,48	50%	14%	36%
	11%	0 0	32%	0,56	0	0,56	35%	24%	11%
	6%	0	50%	0,14	0	0,14	44%	42%	2%

AS = Ausgangssuspension vor der Percoll-Separation
I = Interphase nach der Percoll-Separation
B = Bodensatz nach der Percoll-Separation

RFC = Rosette Forming Cells
MNC = Mononuclear Cells

5.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Monoklonale Antikörper haben in der Regel eine schwächere Affinität als polyklonale Antiseren. Diese ist jedoch einheitlich. Um eine möglichst vollständige Rosettierung der MoAk 9G5-positiven Zellen zu erreichen, wurde versucht, den Kontakt zwischen Antikörper-beschichteten Zellen und SPA-beschichteten Erythrozyten oder den Kontakt zwischen Antikörper und Antigen zu verbessern. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit SPA-beschichteten Schaferythrozyten verbesserte die Rosettierung nicht. Wurde ein zusätzlicher Zweitantikörper eingesetzt, verstärkte sich zwar die Rosettenbildung, doch diese Rosetten konnten nicht vollständig separiert werden und vermehrten sich in einem Fall. Die Bildung instabiler Rosetten, die bei ATG 1202-Rosettierung die vollständige Separation der Rosetten verhindert hatte, war bei Rosettierung mit MoAk 9G5 im Allgemeinen nicht zu beobachten und konnte nur in diesem einen Fall angenommen werden. Durch häufiges Schütteln während der Inkubation der Zellen mit Antikörper konnte die Rosettierung verbessert werden. Die so gebildeten Rosetten wurden durch Zentrifugation vollständig depletiert. Die Rosettierung und Rosettenseparation mit MoAk 9G5 war somit zur T-Zell-Depletion von Knochenmarktransplantaten geeignet.

6. Zellausbeute in der Interphase nach Percoll-Separation rosettierter Knochenmarkzellen

Die Ausbeute mononukleärer Zellen in der Interphase nach Separation über Percoll ist in den Tabellen 7 und 11 dargestellt.
Zur Transplantation in bestrahlte Empfängertiere werden ausschließlich die Zellen der Interphase verwendet. Nach Separation MoAk 9G5 rosettierter Zellsuspensionen war die Ausbeute mononukleärer Zellen in der Interphase wesentlich besser, als nach Separation ATG 1202 rosettierter Zellsuspensionen. Der Anteil rosettierter Zellen in der Ausgangs-

suspension war nach ATG 1202- und nach MoAk 9G5- Rosettierung annähernd gleich. Die Depletion schon bestehender Rosetten erklärt also diesen Unterschied nicht. Vielmehr wurde die Bildung instabiler Rosetten während der Separation, die bei Separation ATG 1202-rosettierter Zellsuspensionen gesehen wurde, bei Separation MoAk 9G5-rosettierter Zellsuspensionen jedoch nicht, dafür verantwortlich gemacht.

7. Nachweis der CFU_{GM} nach Separation rosettierter Knochenmarkzellen

Um nachzuweisen, ob die Separation über Percoll hämopoetische Vorläuferzellen aus der rosettierten Knochenmarkzellsuspension entfernt, wurden aus Ausgangssuspension, Interphase und Bodensatz CFU_{GM}-Kulturen in semisolidem Agar angesetzt. Die Zellkulturen wurden jeweils als Triplets angesetzt. Als Kolonien wurden dabei Zellhaufen von mehr als 50 Zellen, die erkennbar um ein gemeinsames Zentrum angeordnet waren, beurteilt.
Zunächst wurde untersucht, ob die Rosettierung selbst das Koloniewachstum beeinflußt (Tab. 12). Zu diesem Zweck wurden CFU_{GM}-Kulturen aus rosettierten und nicht rosettierten Knochenmarkzellen angesetzt und die Zahl gebildeter Kolonien verglichen.

Tab. 12) CFU_{GM} in Kulturen aus rosettierten und nicht rosettierten Knochenmarkzellen, Mittelwerte aus Triplets

	Hund Nr.	Kolonien MW	SD
rosettierte MNC	N 967	150	10
	28 N	207	25
nicht rosettierte MNC	N 967	148	15
	28 N	206	8

Durch diese Versuche konnte nachgewiesen werden, daß die Rosettierung keinen Einfluß auf die Zahl der Kolonien hatte.

Die CFU_{GM}-Ausbeute nach Separation rosettierter Zellsuspensionen ist in Tabelle 13 dargestellt. Sie wurde aus der Koloniezahl/100 000 MNC und der absoluten Zellzahl der einzelnen Fraktionen errechnet. Die so erhaltenen CFU_{GM}-Werte aus Interphase und Bodensatz wurden als Prozentsatz der in der Ausgangssuspension enthaltenen CFU_{GM}-Zahl ausgedrückt.

Tab. 13) CFU_{GM}, Koloniezahl und Ausbeute bei Verwendung mononukleärer Zellen aus Ausgangssuspension, Interphase und Bodensatz nach Percoll-Separation, Mittelwerte aus Triplets

	Hund Nr.	Kolonien/10^5 MNC Ausgangssuspension MW	SD	CFU_{GM}-Ausbeute AS	I	B
ATG	N 909	33	7	26%	1%	25%
1202	N 909	147	21	16%	0,1%	16%
sep.	N 990	227	18	8%	0	8%
	N 988	98	39	-	-	34%
	N 913	40	16	59%	0	59%
CFU_{GM}-Ausbeute MW(SD): Gesamt: 27% (22) I: 0,3% (0,5) B: 27% (22)						
9G5-	N 969	244	58	41%	41%	0,2%
sep.	N 969	33	7	71%	71%	0,02%
	N 909	147	21	16%	14%	2%
	N 990	227	18	19%	5%	14%
	N 988	98	39	35%	34%	1%
	N 913	40	16	86%	86%	0,2%
	N 909	112	14	66%	66%	0
	N 943	154	13	60%	60%	0
	N 967	148	15	74%	74%	0,4%
	N 988	78	6	47%	47%	0
CFU_{GM}-Ausbeute MW(SD): Gesamt: 52% (24) I: 50% (26) B: 2% (4)						

Die überwiegende Mehrzahl der CFU_{GM} aus der Separation ATG 1202-rosettierter Knochenmarkzellen ging durch die Separation verloren (durchschnittlich 63%) und der verbleibende Rest befand sich fast ausschließlich im Bodensatz. CFU_{GM} aus der Separation nicht rosettierter Knochenmarkzellen waren jedoch nur in geringer Zahl im Bodensatz zu finden (Tab. 5). Zudem war der CFU_{GM}-Verlust aus der Interphase (Tab. 13) wesentlich grösser, als der Verlust mononukleärer Zellen aus der Interphase (Tab. 7). Eine Rosettierung und damit Depletion der CFU_{GM} mit ATG 1202 war damit anzunehmen.

Im Gegensatz dazu befand sich nach Separation MoAk 9G5-rosettierter Knochenmarkzellen ein großer Teil der CFU_{GM} in der Interphase (durchschnittlich 50% der eingesetzten CFU_{GM}). Nur wenige dieser Vorläuferzellen waren im Bodensatz nachzuweisen. Der unspezifische Verlust an CFU_{GM} durch die Percoll-Separation entsprach mit durchschnittlich 49% in etwa dem Separationsverlust mononukleärer Zellen von 47%. Dies ließ eine Rosettierung der CFU_{GM} mit MoAk 9G5 und SPA-SRBC nicht vermuten .

C) Transplantation und Vorversuche zur Transplantation

Eine Reaktivität des MoAk 9G5 mit hämopoetischen Stammzellen konnte nur durch die Transplantation selbst ausgeschlossen werden.

1. Vorversuche zur Transplantation

Um die in den vorangegangenen Versuchen etablierte Separationsmethode zur Separation von Transplantaten verwenden zu können, mußte sie zunächst modifiziert werden.

1.1. Einfluß der Zellkonzentration und der Antikörperkonzentration auf die Rosettenbildung

Die bei einer Transplantation beim Hund anfallende Zellmenge von ca. 2 x 10^9 mononukleärer Zellen würde, eingestellt auf 5 x 10^6 MNC/ml, ein Volumen der Ausgangssuspension von ca. 400 ml ergeben. Dieses Volumen kann nicht ohne grösseren Zellverlust separiert werden, sodaß es notwendig war, die Zellsuspension höher zu konzentrieren. Tabelle 14 zeigt den Verlauf der Rosettenwerte bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen und steigender MoAk 9G5-Verdünnung bei gleichbleibender Konzentration der SPA-beschichteten Schaferythrozyten von 0,5% . Bei Zellkonzentrationen über 1 x 10^7MNC/ml wurden deutlich weniger Rosetten gebildet.

Tab. 14) Rosettierung mit MoAk 9G5 im Knochenmark mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen in % RFC

	Zellkonzentration			
MoAk 9G5 log 2-Titer	1x10^6	5x10^6	1x10^7	5x10^7
4	23%	29%	16%	2%
5	36%	30%	28%	6%
6	12%	36%	26%	5%
7	21%	15%	26%	5%
8	25%	9%	11%	4%
spontan	8%	2%	7%	2%
Maus-N-IgG	12%	17%	5%	3%

1.2. Einfluß der Erythrozytenkonzentration auf die Rosettenbildung

Um auch den Einfluß der SPA-beschichteten Schaferythrozyten erfassen zu können, wurden 2 Zellkonzentrationen ausgewählt (5×10^6 MNC/ml und 5×10^7 MNC/ml) und Erythrozyten-Konzentration und Antikörperkonzentration variiert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Ansätze mit einer Zellkonzentration von 5×10^6 MNC/ml dienten hierbei als Kontrollwerte. Bei einer Zellkonzentration von 5×10^7 MNC/ml war die Rosettierung dann am besten, wenn die Knochenmarkzellen mit 5%iger Erythrozytensuspension inkubierten und der MoAk 9G5
1 : 32 (log 2-Verdünnung 5) verdünnt wurde. Die Rosettierung dieser Proben war sogar besser, als die Rosettierung der Kontrollwerte. Erhöhte man also Zellkonzentration und Erythrozytenkonzentration proportional, verbesserte sich die Rosettierung.

Tab. 15) Rosettierung mononukleärer Knochenmarkzellen mit unterschiedlichen Antikörperund Erythrozytenkonzentrationen, Vergleich der beiden Zellkonzentrationen 5 x 10^6 MNC/ml und 5 x 10^7 MNC/ml

	Zellkonzentration $5x10^6$ MNC/ml			Zellkonzentration $5x10^7$ MNC/ml		
MoAk 9G5 log 2-Titer	Erythrozyten-Konzentration 0,5%	2%	5%	0,5%	2%	5%
	Versuch Nr.	RFC in %				
5	1	40%	46%	50%	4%	55%	57%
	2	21%	24%	25%	7%	7%	28%
6	1	26%	28%	29%	2%	14%	7%
	2	17%	20%	29%	19%	15%	23%
7	1	29%	11%	19%	12%	4%	22%
	2	27%	21%	8%	6%	7%	24%
8	1	20%	15%	6%	3%	12%	11%
	2	8%	16%	5%	4%	7%	10%
spon-	1	3%	5%	0	3%	3%	1%
tan	2	12%	12%	3%	3%	8%	7%
Maus	1	8%	8%	10%	1%	12%	5%
N-IgG	2	10%	7%	13%	5%	7%	3%

Die Separation rosettierter Zellsuspensionen mit erhöhter Zellkonzentration und Erythozytenkonzentration führte zu einer vollständigen Depletion der Rosetten aus der Interphase (Tabelle 16). Auch Immunfluoreszenz-positive Zellen konnten annähernd vollständig depletiert werden. Bei einer Konzentration von $2x10^8$ MNC/ml verklumpten die Zellen in der Interphase und die Zellklumpen konnten nicht mechanisch aufgelöst werden.

Tab. 16) Separation der MoAk 9G5-Rosetten mit erhöhter Zellkonzentration über Percoll 1,085. Rosettierung, Immunfluoreszenz, Ausbeute mononukleärer Zellen der Einzelfraktionen und CFU_{GM}-Ausbeute

	MNC $5x10^6$/ml SPA-SRBC 0,5%			MNC $5x10^7$/ml SPA-SRBC 5%			MNC $2x10^8$/ml SPA-SRBC 20%		
	AS	I	B	AS	I	B	AS	I	B
Rosettierung in % RFC	6%	0	50%	11%	0	50%	14%	0	50%
Zellausbeute in %		42%	2%		39%	6%		23%	17%
Immunfl. pos. in %	17%	1%	n.d.	17%	0	37%	17%	1%	50%
CFU_{GM}-Ausbeute in %		66%	0		63%	0,1%		56%	0

2.Transplantation

Um den Einfluß der T-Zell-Depletion des Knochenmarks mit MoAk 9G5-SPA-SRBC-Rosetten auf das Anwachsen des Knochenmarks und die GvH-Krankheit beim Hund zu überprüfen, wurden Knochenmarktransplantationen durchgeführt. Zunächst wurden zwei Hunde autolog transplantiert, um nachzuweisen, ob diese Transplantate in der Lage waren, eine hämopoetische Rekonstitution zu vermitteln. Die allogene Transplantation erfolgte von DLA-homozygoten Geschwistertieren auf DLA-heterozygote Empfänger. Spender und Empfänger stimmten in einem Haplotyp überein. Die Histokompatibilitätsantigene wurden serologisch bestimmt. In der gemischten Lymphozytenkultur wurden Spenderlymphozyten durch Empfängerlymphozyten stimuliert, Empfängerlymphozyten aber nicht durch Spenderlymphozyten. In dieser Spender-Empfänger-Kombination war zwar eine starke Graft-versus-Host Reaktion zu erwarten, nicht jedoch eine Abstoßungsreaktion. Kolb et al. (1979) transplantierten Hunde in dieser Spender-Empfänger-Kombination und die Empfänger der haploidentischen Transplantate verstarben innerhalb weniger Wochen an akuter Graft-versus-Host Krankheit. Spender und Empfänger waren gegengeschlechtlich. So konnten die vom Spendermark stammenden Zellen in Blut und Knochenmark des Empfängers durch den Nachweis der Geschlechtschromosomen zytogenetisch ermittelt werden.

Der Empfänger wurde am Tag vor der Transplantation mit 1200 R (1 R = 2,58 x 10^{-4} C/Kg) mit einer Dosisleistung von 5,5 R/Minute Ganzkörperbestrahlung vorbehandelt. Die Bestrahlung wurde in der Bestrahlungsanlage der Gesellschaft für Strahlenund Umweltforschung, München vorgenommen, die aus zwei gegenüberliegenden ^{60}Kobaltquellen besteht.

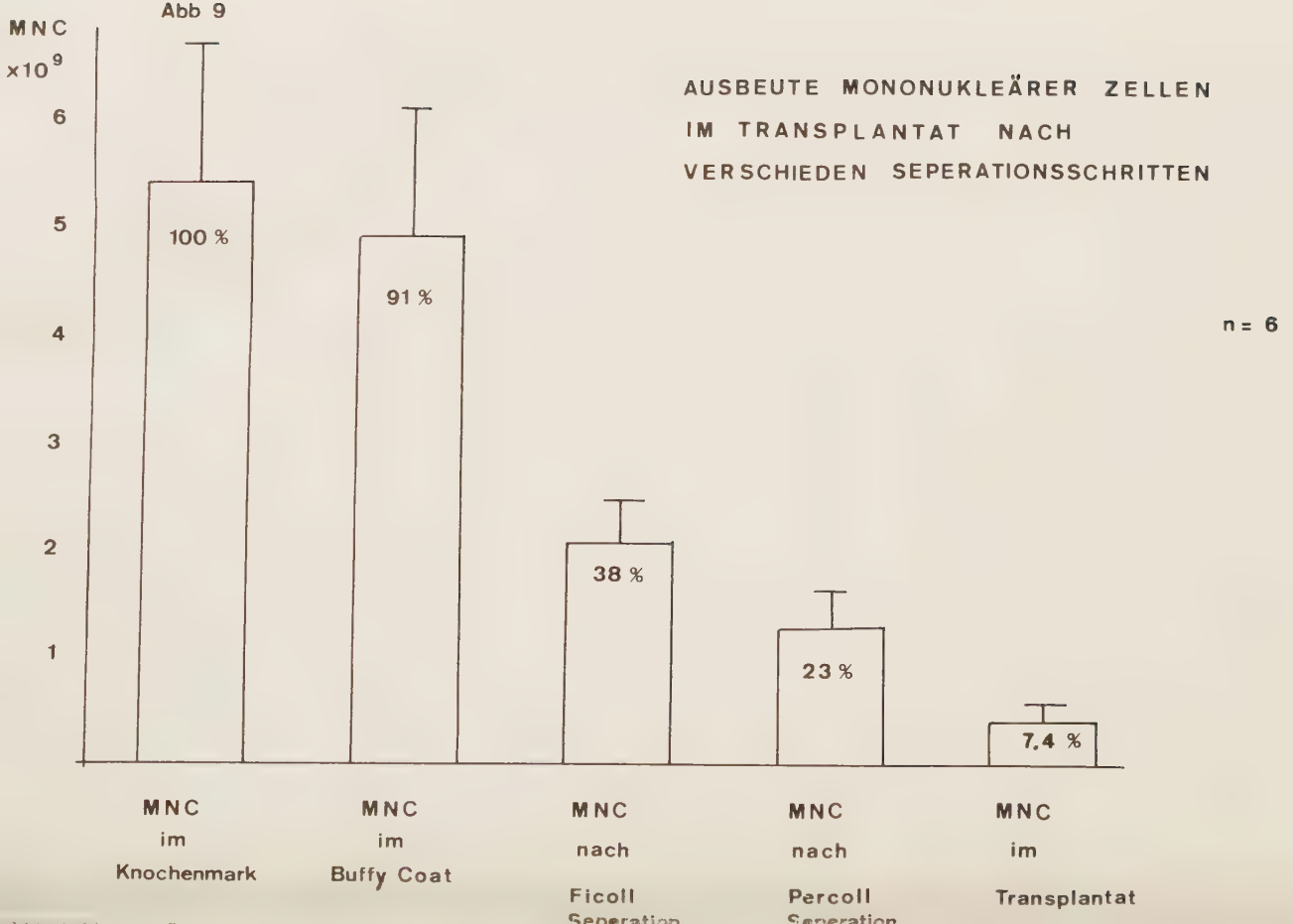
Die Knochenmarkentnahme beim Spender erfolgte in Vollnarkose am Tag der Transplantation. Das Knochenmark wurde aus Oberarm- und Oberschenkelknochen und aus den Beckenkämmen durch Aspiration gewonnen. Dabei wurden ca. 25 bis 30 ml Knochenmark/kg KG entnommen. Das Knochenmark wurde über zwei rostfreie Stahlfilter mit Maschenweiten von 0,3 mm und 0,2 mm

gefiltert.
Zur Isolierung der mononukleären Zellen aus dem Knochenmark wurde zunächst der "Buffy Coat" kernhaltiger Zellen gewonnen und dieser über Ficoll der Dichte 1,077 g/ml separiert. Die weitere Behandlung des Knochenmarks bis zur transplantationsfähigen Zellsuspension ist im Abschnitt "Material und Methoden" detailliert beschrieben. Zur Überprüfung des T-Zell Gehaltes und des Gehaltes an hämopoetischen Vorläuferzellen wurde mit Zellen aus aus Ausgangssuspension, Interphase und Bodensatz eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und CFU_{GM}-Kulturen angesetzt.

2.1. Zellverlust bei aufeinanderfolgenden Separationsschritten

Der Zellverlust bei aufeinanderfolgenden Separationsschritten ist in Abbildung 9 dargestellt. Dem Spenderhund wurden durchschnittlich 316 ml Knochenmark entnommen. Darin waren $8,9 \times 10^9$ Gesamtleukozyten enthalten mit einem Anteil mononukleärer Zellen von 60,7%, das entspricht $5,4 \times 10^9$ MNC. Einer maximalen Blutbeimengung konnten $0,53 \times 10^9$ MNC entstammen . Nach Herstellung des Buffy Coats wurden 91% der mononukleären Zellen wiedergewonnen. Nach der Ficoll-Separation standen noch 38% der im entnommenen Knochenmark vorhandenen MNC zur Verfügung, das entspricht durchschnittlich $2,04 \times 10^9$MNC.
Durch die Percoll-Separation erfolgte eine Aufspaltung der einheitlichen Zellsuspension in Interphase und Bodensatz. Die zur Transplantation verwendete Interphase enthielt noch 7,4% der mononukleären Zellen des entnommenen Knochenmarks.

Abb 9



AUSBEUTE MONONUKLEÄRER ZELLEN
IM TRANSPLANTAT NACH
VERSCHIEDEN SEPERATIONSSCHRITTEN

n = 6

2.2. Rosettierung und Separation der Transplantate

Die mononukleären Knochenmarkzellen wurden in einer Konzentration von 5 x 10^7 MNC/ml mit MoAk 9G5 (log 2-Verdünnung 5 in Hanks-Medium) und 5%iger SPA-Erythrozytenlösung rosettiert und anschließend über Percoll der Dichte 1,085 g/ml separiert.
Tabelle 17 zeigt die Rosettierung der Einzelfraktionen, die Rosettenausbeute und die Ausbeute mononukleärer Zellen nach Separation.

Tab. 17) Separation der MoAk 9G5-rosettierten Transplantate über Percoll (1,085)

Rosettierung in % RFC			Rosetten Ausbeute	Zell-Ausbeute
AS	I	B	Gesamt	Gesamt
31%	0	60%	0,53	47%
52%	0,6%	84%	1,18	86%
21%	0,3%	64%	1,55	74%
22%	0	80%	0,88	46%
28%	0,2%	65%	1,21	71%
59%	0,5%	77%	1,01	92%

AS = Ausgangssuspension vor der Percoll-Separation
I = Interphase nach der Percoll-Separation
B = Bodensatz nach der Percoll-Separation
RFC = Rosette Forming Cells

Nach Inkubation der Zellsuspensionen mit MoAk 9G5 (während der Inkubation wurden die Suspensionen regelmäßig geschüttelt) und SPA-SRBC waren durchschnittlich 32% der Zellen

rosettiert; dies entspricht den Ergebnissen der in vitro-Versuche mit kleineren Zellmengen.
Die Ausbeute mononukleärer Zellen war nach Separation von Knochenmarktransplantaten besser als nach Separation kleinerer Zellmengen.

In Tabelle 18 sind Rosettierung, mononukleäre Zellen und CFU_{GM} in der Interphase als Anteil der Ausgangssuspension dargestellt.

Tab. 18) T-Zell-Depletion von Knochenmark-Transplantaten durch SPA-Rosettierung mit MoAk 9G5. Anteil der mononukleären Zellen, CFU_{GM} und T-Rosetten, in der Interphase nach Separation

Empfänger	MNC	CFU_{GM}	T-Rosetten
Autolog			
N 875	0,21	-	$3,7 \times 10^{-3}$
N 865	0,15	-	$1,6 \times 10^{-3}$
Allogen			
N 945	0,17	0,60	unter $2,8 \times 10^{-3}$
N 965	0,24	0,74	$2,9 \times 10^{-3}$
N 988	0,18	-	$1,3 \times 10^{-3}$
31 N	0,15	0,44	$1,1 \times 10^{-3}$

Die Zellausbeute und auch die Ausbeute an CFU_{GM} in der Interphase entsprach in etwa derjenigen nach Separation kleinerer Zellmengen. Nach 2 - 3 Separationen über Percoll 1,085 enthielt die Interphase noch geringe Anteile rosettierter Zellen (0,11 bis 0,37%).

In Tabelle 19 ist die Anzahl transplantierter mononukleärer Zellen, CFU_{GM} und rosettierter T-Zellen dargestellt.

Tab. 19) Zusammensetzung der Knochenmarktransplantate nach T-Zell-Depletion durch SPA-Rosettierung mit MoAk 9G5

Spender Nr.	Körper-gewicht	MNC absol.	/kgKG	T-Rosetten absol.	/kgKG	CFU_{GM} /kgKG
	kg	$x10^6$	$x10^5$	$x10^6$	$x10^5$	$x10^5$
Autolog						
N 875	15,1	512	339	u.2,05	u.1,36	-
N 865	15,5	201	130	1,35	0,87	443
Allogen						
N 945	15,7	314	300	u.1,6	u.1	110
N 965	11,3	555	490	1,39	1,2	223
N 988	11,2	460	410	0,92	0,83	61
31 N	13,0	150	115	0,75	0,58	80

2.3. Immunfluoreszenz mit MoAk 9G5

Durch die Anfertigung von Immunfluoreszenzpräparaten wurde zusätzlich überprüft, wieviele MoAk 9G5-positive Zellen in der Interphase noch enthalten waren. Zellen der Ausgangssuspension und des Bodensatzes dienten als positive Kontrolle. Interphase und Bodensatz wurden mit hämolytischem Puffer gewaschen, um bestehende Rosetten aufzulösen. Durch FITC-Kontrollen (ohne Erstantikörper) wurden anhaftende MoAk 9G5-Moleküle auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Eine Kreuzreaktion anderer Antikörper im Maus-Serum wurde durch Kontrollen mit Maus-Normal-IgG überprüft. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tab. 20) Immunfluoreszenz mit mononukleären Zellen aus Ausgangssuspension, Interphase und Bodensatz, % positive Zellen

Empf.	Ausgangss.			Interphase			Bodensatz		
	9G5	FITC	N-IgG	9G5	FITC	N-IgG	9G5	FITC	N-IgG
Autolog									
N 875	23%	0	0	0,5%	0	0	42%	0	0
N 865	71%	-	-	3%	-	-	80%	-	-
Allogen									
N 945	26%	0	-	1%	0	-	45%	3%	-
N 965	32%	0	1%	2%	0	0,5%	25%	0	0
N 988	38%	0,4%	0	0,3%	0	0	6,5%	0	0
31 N	31%	0,3%	0,2%	0,5%	0	0,4%	27%	0,8%	0,4

Die Zahl Immunfluoreszenz-positiver Zellen in der Interphase war in einigen Fällen höher als die Zahl Rosetten-bildender Zellen; im Bodensatz war sie in der Regel erheblich niedriger. Diese niedrigen Kontrollwerte im Bodensatz deuteten daraufhin, daß die Antigene auf der Zelloberfläche für den monoklonalen Antikörper 9G5 nicht frei zugänglich waren. Die Antigene konnte durch anhaftendes SPA und/oder Membranbestandteile der Schaferythrozyten abgedeckt gewesen sein. Die Immunfluoreszenz nach Separation erfasste also die Rosettenbildenden T-Zellen im Bodensatz nur zum Teil. Andererseits erfaßte die Immunfluoreszenz in der Interphase auch Zellen mit geringer Antigendichte, die keine Rosetten bildeten.

2.4. Klinischer Verlauf nach Transplantation

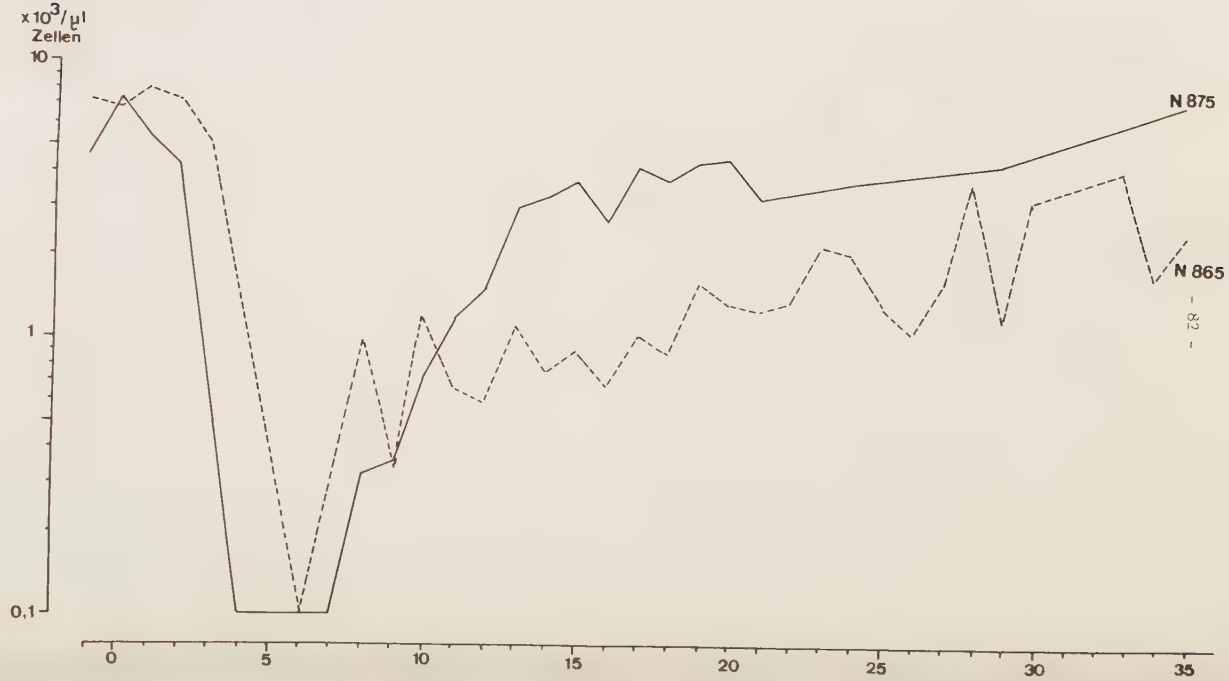
Nach der zuvor beschriebenen Methode wurden zunächst die Hunde N 875 und N 865 mit T-Zell-depletiertem Knochenmark autolog transplantiert. Einer der beiden autolog transplantierten Hunde (N 875) zeigte eine starke anaphylaktische Reaktion, während die Zellsuspension intravenös infundiert wurde. Die Anaphylaxie wurde wahrscheinlich durch restliche Schaferythrozyten oder anhaftendes SPA verursacht.
In Abbildung 10 ist der Verlauf der Granulozytenzahlen im peripheren Blut dargestellt.
Tabelle 21 zeigt die Verdopplungszeit der Leukozytenund Thrombozytenwerte und den Lymphozytenwert ein Jahr nach Transplantation im Vergleich zu autolog transplantierten Hunden ohne T-Zell-Depletion (frühere Versuche) .

Tab. 21) Erholung der Blutwerte nach autologer Knochenmarktransplantation mit und ohne T-Zell-Depletion

Tag des Anstiegs der	mit T-Zelldepletion N 865	N 875	ohne T-Zell-Depletion MW ± SD (n = 10)
Leukozyten/mm^3			
350	8	9	8,6 ± 1,2
700	8	9	10,9 ± 2,1
1400	22	11	14,0 ± 3,2
2800	33	12	19,7 ± 5,6
Thrombozyten/mm^3			
40000	42	13	26,4 ± 6,4
80000	44	22	29,4 ± 7,5
160000	56	26	35,4 ± 7,8
Tag 360, Lymphozyten /mm^3	792	254	1875 ± 681

Abb. 10

Granulozyten im peripheren Blut bei Hunden nach Transplantation T-Zell-depletierten autologen Knochenmarks

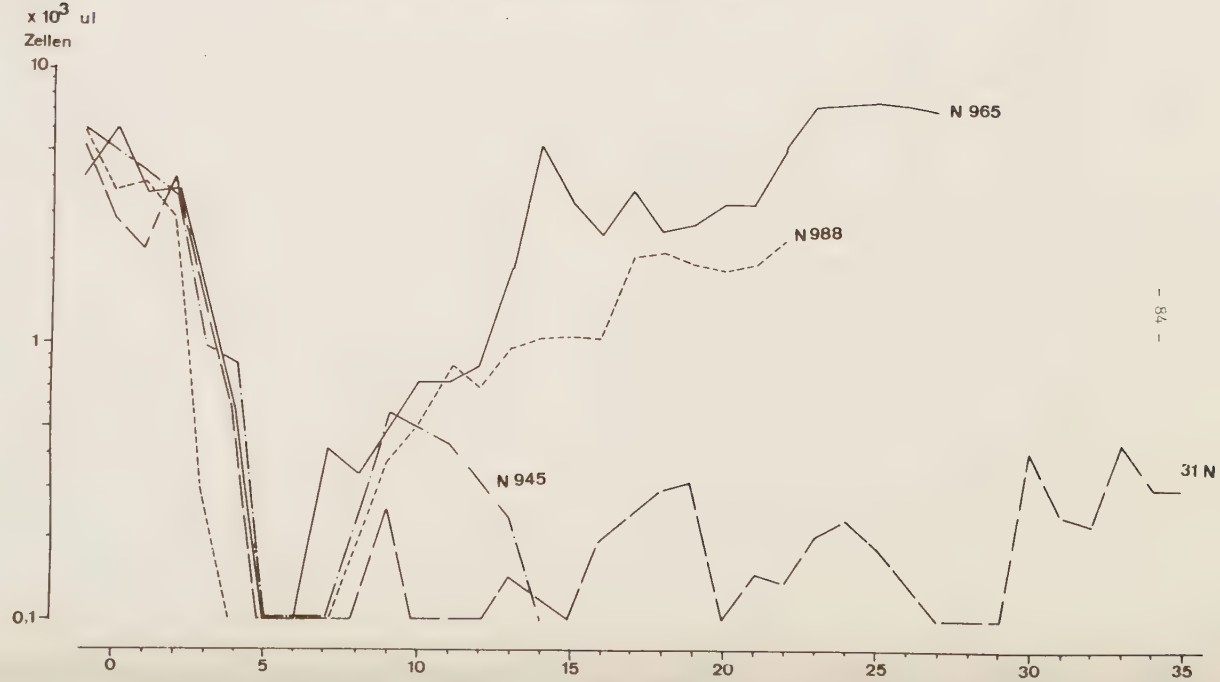


Durch die autologe Transplantation konnte nachgewiesen werden, daß im Transplantat nicht nur Vorläuferzellen der granulozytär-monozytären Reihe (CFU_{GM}) sondern auch pluripotente Stammzellen enthalten waren.
Die beiden transplantierten Hunde erholten sich innerhalb der ersten beiden Wochen nach Transplantation. Der initiale Anstieg der Leukozyten erfolgte bei beiden Hunden rasch. Bei N 875, der 0,339 x 10^8 MNC/kgKG erhalten hatte, entsprach der Anstieg der Leukozytenund Thrombozytenwerte den Werten nach autologer Transplantation von 1 x 10^8 MNC/kgKG ohne T-Zell-Depletion. Bei N 865, der nur 0,13 x 10^8 MNC/kgKG erhalten hatte, war dagegen der weitere Anstieg der Leukozytenwerte und der Anstieg der Thrombozytenwerte verzögert. Bei beiden Hunden war noch ein Jahr nach Transplantation die Zahl peripherer Lymphozyten erniedrigt.

Vier Hunde wurden allogen transplantiert (Abbildung 11). Die Empfänger N 965 und N 988 erhielten mehr als 0,4 x 10^8 MNC/kgKG und mehr als 0,8x10^5 RFC/kg KG und entwickelten, nachdem das Transplantat rasch angewachsen war, akute GvHD, die sich bei Empfänger N 965 in Durchfall, Rhinitis, Konjunktivitis und Ikterus, bei Empfänger N 988 in Konjunktivitis, Rhinitis und Ikterus äusserte. Bei beiden Hunden wurden am Tag 25 bzw. 20 nach Transplantation zytogenetisch ausschließlich Spenderzellen nachgewiesen. Der Hund N 965 wurde am 27. Tag, Der Hund N 988 am 22. Tag nach Transplantation mit schwerer GvH-Krankheit euthanasiert. Nach Transplantation von nur 0,2 x 10^8 MNC/kgKG zeigte der Empfänger N 945 am 9. Tag nach Transplantation nur einen kurzzeitigen Anstieg der Granulozyten im peripheren Blut (Abbildung 11) und wurde am 32. Tag in der Aplasie euthanasiert. Die vierte allogene Knochenmarktransplantation wurde mit noch geringerer Zellzahl durchgeführt. Der Empfänger 31 N erhielt nur 0,115 x 10^8 MNC/kgKG. Auch hier stieg die Zahl der Granulozyten im peripheren Blut am 9. Tag nach Transplantation kurz an und fiel dann wieder ab. In den nächsten Wochen schwankte die Granulozytenzahl zwischen 0 und 720 /mm^3. Am

Abb. 11

Granulozyten im peripheren Blut bei Hunden nach Transplantation T-Zell-depletierten allogenen Knochenmarks



21. und 42. Tag wurden zytogenetisch nur Empfängerzellen nachgewiesen und der Hund starb am 43. Tag nach Transplantation in der Aplasie.

In den hier beschriebenen Separationen war eine stärkere T-Zelldepletion in der Regel auch mit einem höheren Verlust an mononukleären Zellen verbunden. Ein dauerhaftes Anwachsen des Transplantates war deutlich von der Zahl der transplantierten mononukleären Zellen/kg Körpergewicht abhängig. Mit $0,4 \times 10^8$ MNC/Kg KG wuchs das Knochenmark an, die Tiere starben aber an akuter GvH-Krankheit. Mit geringerer Zellzahl konnte dagegen keine hämopoetische Rekonstitution erreicht werden.

Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine T-Zell-Depletionsmethode für Knochenmark-Transplantate zu entwickeln, die eine nachweisbare Eliminierung von mehr als 99% der immunkompetenten T-Zellen ermöglicht. Mit Hilfe der Transplantation des depletierten Knochenmarks bei Hunden sollte der Zusammenhang zwischen residuellem T-Zellgehalt und Graft-versus-Host Krankheit bzw. Transplantatabstoßung ermittelt werden.

Als Depletionsmethode wurde die Rosettenseparation gewählt, die sich am menschlichen Knochenmark als besonders effektiv erwiesen hatte (Wilhelm et al. 1986, Lewitt et al. 1985). T-Lymphozyten des Hundes exprimieren jedoch keinen SRBC-Rezeptor, so daß in diesem System die Rosettierung durch spezifische Antikörper und Staphylokokken-Protein A vermittelt werden mußte.
Die Spezifität mehrfach absorbierter, polyklonaler Kaninchen-Antiseren (ATG) gegen Hunde-T-Zellen wurde von Holler et al. (1984) untersucht. Über Nylon-Wolle separierte, nicht adhärente Hundelymphozyten (NADC) reagierten gut auf PHA als Mitogen und allogene Lymphozyten. Dieselbe Zellpräparation enthielt fast ausschließlich ATG-positive Zellen, während adhärente Zellen zu einem geringeren Prozentsatz positiv waren. Die immunhistologische Verteilung ATG-positiver Zellen in lymphatischen Organen beim Hund entsprach der von T-Zellen bei Mensch und Maus (Hofmann-Fezer et al. 1976 und 1981).
Das von uns verwendete polyklonale Antiserum ATG 1202 wurde in gleicher Weise hergestellt und absorbiert. Die Rosettenbildung des ATG 1202 in Thymus, Milz, Knochenmark und peripherem Blut entsprach der Rosettenbildung mit ATG 1069 in den von Holler et al. (1984) untersuchten Organen. ATG 1069 wurde erfolgreich zu Graft-versus-Host Prophylaxe beim Hund eingesetzt (Kolb et al. 1979), in dem verwende-

ten System konnte jedoch das Ausmaß der T-Zell-Depletion durch ATG nicht ermittelt und nicht von anderen Inaktivierungsmechanismen (Opsonisierung der T-Zellen und Elimination in vivo) abgegrenzt werden.
Durch die Etablierung einer Rosettenseparationsmethode mit Antithymozytenglobulin wurde versucht, die Wirkungsweise des Antithymozytenglobulins auf die Graft-versus-Host Krankheit beim Hund aufzuklären.

Diesem Antiserum wurde der monoklonale Antikörper 9G5 gegenübergestellt, der sich durch seine hohe Spezifität und seine ausreichende Affinität zu einem T-Lymphozyten-Antigen des Hundes auszeichnet.
Unterschiedliche T-Zell-Antigene des Hundes wurden durch monoklonale Antikörper charakterisiert. Eine Auflistung monoklonaler Antikörper gegen Hunde-T-Zellen ist in Tabelle 1a dargestellt. Die Mehrzahl dieser Antigene ist artspezifisch und nur wenige Anti-human-T-Antikörper reagieren auch mit Hunde-T-Zellen (Anti-human-T8 T811). Das Thy-1-Antigen des Hundes wurde durch den monoklonalen Antikörper F3-20-7 anhand der Kreuzreaktivität mit Thy-1 Antigen der Ratte bestimmt. Die Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen Hunde-T-Zellen muß somit überwiegend durch den Nachweis einer T-Zell-spezifischen Gewebeverteilung des Antigens erfolgen. Hierbei dient die Anfärbung histologischer Schnitte aus lymphatischen Organen dem Nachweis der Spezifität (T-Areale in Lymphknoten und Milz) und der Abgrenzung von Differenzierungsntigenen (Thymusrinde und -mark). Die Reaktivität eines Antikörpers in Zellsuspensionen erfasst den Anteil erkannter Zellen quantitativ und läßt Rückschlüsse auf die Antigendichte und die Affinität des Antikörpers zu.
Der monoklonale Antikörper 9G5 ist histologisch durch die Markierung T-spezifischer Areale in Lymphknoten und Milz und des Thymusgewebes als T-Zell-spezifisch definiert (Mysliwietz et al. 1987). Hierin gleicht er dem monoklonalen Antikörper Aby 1A1, der jedoch zusätzlich mit Binde-

gewebe reagiert, so daß beide Antikörper vermutlich nicht dasselbe Antigen erkennen. Das von MoAk 9G5 erkannte Antigen wird von reifen und unreifen T-Zellen im Thymus exprimiert und stimmt somit auch nicht mit dem von MoAk Aby 6C6 erkannten Antigen überein, das nur von reifen T-Zellen und auch von B-Zellen exprimiert wird. Die Reaktivität des MoAk Dly 6 im Thymus deutet darauf hin, daß dieses Antigen von Thymuszellen erst später im Verlauf der Differenzierung exprimiert wird und bei peripheren T-Zellen erhalten bleibt.

Auch in der Reaktivität mit Zellsuspensionen und im erkannten Antigen konnte keine Übereinstimmung des MoAk 9G5 mit anderen monoklonalen Antikörpern gegen Hunde-T-Zellen gefunden werden. Der monoklonale Antikörper DT 2 reagiert mit einem kleineren Teil der Thymus- und peripheren Blutzellen und das markierte Antigen unterscheidet sich im Molekulargewicht deutlich vom MoAk 9G5-Antigen. Der monoklonale Antikörper Dly 1 markiert zwar eine große Zahl peripherer T-Zellen, nicht jedoch Thymuszellen, und reagiert, im Gegensatz zum MoAk 9G5, auch mit Monozyten und Granulozyten.

Ein wichtiges Kriterium für die Verwendbarkeit eines monoklonalen Antikörpers in der T-Zelldepletion von Knochenmark ist der Nachweis, daß das von ihm erkannte Antigen in ausreichendem Ausmaß von peripheren T-Zellen, nicht jedoch von Stammzellen exprimiert wird. Seine Reaktivität mit mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut bzw. dem Ductus Thoracicus repräsentiert den Anteil markierter peripherer T-Zellen, während die Zahl markierter Thymuszellen und deren Nachweis in Thymusrinde oder -mark Rückschlüsse auf die Antigenexpression im Verlauf der Differenzierung zuläßt. Mehrere monoklonale Antikörper gegen Hunde-T-Zellen erkennen einen hohen Prozentsatz peripherer T-Zellen (Dly 1, Dly 6, Aby 6C6, DT 2, Aby 1A1), wobei die hohe Zahl erkannter Thymuszellen durch DT 2 darauf hinweist, daß dieses Antigen auch von unreiferen T-Zellen exprimiert wird. Der monoklonale Antikörper 9G5 erkennt

über 90% der T-Zellen in Thymusrinde und -mark.
Die Zahl markierter Knochenmarkzellen gibt Hinweise auf die Reaktivität eines Antikörpers mit anderen Zellen als T-Zellen, doch nur die Reaktion mit granulozytär-monozytären Vorläuferzellen wurde in vitro durch die Hemmung des CFU-GM-Wachstums nachgewiesen. Einzige Nachweismöglichkeit für die Reaktion eines Antikörpers mit Stammzellen ist die Transplantation von Knochenmark, aus dem Antikörper-positive Zellen depletiert wurden. Eine große Zahl mononukleärer Knochenmarkzellen wird von Aby 6C6 und MoAk 7.2 erkannt. Die Depletion von Knochenmark-Transplantaten mit dem Anti-human-Ia Antikörper 7.2 und Komplement verhinderte das Anwachsen autologer Transplantate beim Hund ganz (Schuening et al. 1987), die Depletion mit dem gegen Ia-exprimierende Hunde-T-Zellen gerichteten Antikörper WM2 teilweise (Prendergast et al. 1986). Das Ia-Antigen wird von menschlichen hämopoetischen Vorläuferzellen ebenfalls exprimiert (Fitchen et al 1980).
Nur wenige Autoren testeten die Reaktivität der monoklonalen Antikörper mit hämopoetischen Vorläuferzellen. Die Antikörper Dly 1 und Dly 6 reagierten, ebenso wie der in dieser Arbeit verwendete MoAk 9G5, nicht mit granulozytär-monozytären Vorläuferzellen.
Das T-Zell-Antigen Thy-1 konnte auf Knochenmarkzellen (MoAk F3-20-7) und auf hämopoetischen Vorläuferzellen des Hundes und der Ratte, im Gegensatz zum Menschen, nachgewiesen werden (McKenzie et al. 1981).
Der verwendete monoklonale Antikörper 9G5 reagierte weder mit hämopoetischen Vorläuferzellen (keine Depletion von CFU-GM durch die Rosettenseparation), noch mit Stammzellen (autologe Transplantate, die MoAk 9G5 depletiert wurden, führen im letal bestrahlten Empfänger zur Restitution der Hämopoese).

In Versuchen zur Spezifität wurde nachgewiesen, daß die von MoAk 9G5 erkannte Zellpopulation auch mit ATG 1202 reagierte. Das polyklonale Antiserum erkannte jedoch zusätzlich einen relativ hohen Prozentsatz mononukleärer Blut- und Knochenmarkzellen. Dabei fiel besonders die starke Reaktion mit Milzzellen auf, aus der auf eine ungenügende Absorption des, mit Milz absorbierten, Antiserums geschlossen wurde. Im CFU_{GM}-Test konnte die Reaktion des Antiserums mit hämopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Offensichtlich konnten trotz mehrfacher Absorptionen an Leber, Niere, Erytrozyten, Milz und Knochenmark neugeborener Welpen Antikörper gegen hämopoetische Vorläuferzellen nicht in einem für die Rosettendepletion ausreichenden Maß entfernt werden. Das Antiserum 1069 unterdrückte in Verbindung mit Hundeserum das CFU_{GM}-Wachstum jedoch nicht und konnte in 8 von 10 Hunden die Graft-versus-Host Erkrankung verhindern (Kolb et al. 1980). Um die CFU_{GM}-Hemmung nachzuweisen, verwendeten Kolb et al. das Antiserum 1069 in Verbindung mit Hundeserum als Komplementquelle. Die hämopoetischen Vorläuferzellen wurden zwar in diesem System nicht lysiert, jedoch bei Zusatz von Kaninchenserum als Komplementquelle. Zur GvH-Prophylaxe wurde kein exogenes Komplement zugesetzt und die Aktivierung zellulärer Abwehrmechanismen in vivo genutzt. Die Rosettenseparation eliminiert jedoch alle Antikörper-bindenden Zellen, ohne eine solche Aktivierung zu benötigen. Die Reaktivität des Antiserums ATG 1202, das in der log 2-Verdünnung 7 eingesetzt wurde, mit hämopoetischen Vorläuferzellen reichte also aus, eine Rosettenbildung hämopoetischer Vorläuferzellen zu induzieren, die Reaktivität des Antiserums ATG 1069 in der Verdünnung 1 : 200 mit hämopoetischen Vorläuferzellen reichte jedoch nicht aus, Komplement zu aktivieren oder eine Elimination dieser Zellen in vivo hevorzurufen.
Die höhere Antiserumkonzentration zur Rosettierung wurde mit ATG 1202 und auch mit ATG 1069 (Holler et al. 1984) benötigt, um eine Rosettierung aller T-Zellen zu garan-

tieren. Da absorbierte Antithymozytenglobuline in der Regel noch Anteile mit Stamm- oder Vorläuferzellen kreuzreagierender Antikörper enthalten, verstärkt jede Konzentrationserhöhung auch die Kreuzreaktivität mit hämopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, so daß eine T-Zell-Depletion mit absorbiertem Antithymozytenglobulin nur dann möglich ist, wenn durch die Absoption kreuzreagierende Antikörper weitestgehend eliminiert wurden und das Antiserum in ausreichender Konzentration zur Rosettierung eingesetzt werden kann.
Weiterhin stellte sich heraus, daß die ATG-vermittelten Rosetten nicht über Dichtegradienten separiert werden konnten. Spontanrosetten oder Rosetten, die unter Verwendung von Kaninchen-Normal-IgG gebildet wurden, konnten jedoch nach dem gleichen Verfahren separiert werden. Die in dem polyklonalen Antiserum enthaltenen schwach affinen Antikörper bewirkten eine Auflösung und Neubildung von Rosetten im Verlauf der Separation, die sich einerseits in einer absoluten Rosettenvermehrung äusserte, andererseits die effektive Separation der Rosetten verhinderte. Die Beteiligung von FC-Rezeptoren an dieser instabilen Rosettenbildung konnte nicht endgültig geklärt werden, da der Zusatz von autologem Serum zum Waschmedium zur Abdeckung der FC-Rezeptoren die Separation zwar verbesserte, eine Vorinkubation der Zellen in autologem Serum, die denselben Zweck verfolgte, die Separation aber verschlechterte. Dabei gelang die Separation mononukleärer Blutzellen wesentlich besser, als die Separation mononukleärer Knochenmarkzellen. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Rosettenbildung nicht nur von der Affinität des Antikörpers, sondern auch von der Antigendichte auf der Zelloberfläche abhängt. Knochenmark enthält Zellpopulationen mit sehr unterschiedlicher Antigendichte, die durch die verwendeten Antikörper markiert wurden, während die ATG 1202- bzw. MoAk 9G5-positiven Zellen im Blut eine Population mit relativ einheitlicher Antigendichte bilden. Dies äussert sich mit ATG 1202 und mit MoAk 9G5 in Rosettierung

und Immunfluoreszenz in einer gleichmässigen Abnahme positiv reagierender Zellen mit steigender Antikörperverdünnung im Knochenmark. Im Blut dagegen war in der Regel eine deutliche Plateaubildung zu beobachten.

Die Rosettierung mit MoAk 9G5 wurde zunächst dadurch behindert, daß Immunglobuline der Maus sich wesentlich schlechter an Staphylokokken-Protein A binden als Kaninchen-IgG. Dessen SPA-Bindungskapazität ist über 20 mal so hoch, als die des Maus-IgG (Richman et al. 1982). Eine stärkere Beschichtung der Schaferythozyten mit SPA konnte diesen Mangel ausgleichen. Auch die Affinität des MoAk 9G5 zum zellulären Antigen war geringer, so daß die Inkubationszeit, in der die Zellen noch suspendiert waren und sich nicht abgesetzt hatten, nicht für die Bindung an zelluläre Antigene ausreichte. Durch häufiges Schütteln während der Inkubation mit Antikörper konnte jedoch ein gleichmässiger Antigen-Antikörper-Kontakt während der gesamten Inkubationszeit gewährleistet werden. Die Depletion reifer T-Zellen aus Hundeknochenmark gelang mit MoAk 9G5 weitestgehend. Die T-Zellelimination von durchschnittlich 99,8% entspricht derjenigen, die durch Separation direkter (Levitt et al. 1985, Fischer et al. 1986) oder Antikörper-vermittelter (Wilhelm et al. 1986) Rosetten ohne SPA erzielt wurde. Ähnliche Ergebnisse erreichten Slocombe et al. 1986 mit Rosettierung und Sojabohnen-Lektin Fraktionierung. Levitt et al. (1985) wiesen in Transplantaten nach Inkubation mit zwei monoklonalen Antikörpern (Leu 1 und TM 1) und Komplement noch 3,2 bis 5,1% reife T-Zellen nach, während der IgM-Antikörper Campath 1 mit Komplement 99,2 bis 99,7% der T-Zellen eliminierte (Apperley et al. 1986). Blazar et al. (1985) konnten mit Sojabohnenlektin-Fraktionierung und Rosettenseparation alle nachweisbaren T-Zellen entfernen. Die Dichtegradientenseparation ohne weitere Hilfsmittel war im Vergleich dazu weniger erfolgreich. Nach Zellelutriation waren noch 1 - 3% der T-Zellen im Transplantat enthalten (Noga et al.

1986, de Witte et al. 1984, de Witte et al. 1986), während Albumingradienten zwar zur Stammzellanreicherung, nicht jedoch zur nachgewiesenen T-Zell-Depletion verwendet wurden (Dicke et al. 1968, Körbling et al. 1979, Gerhartz et al. 1985).

Im CFU_{GM}-Test wurde nachgewiesen, daß MoAk 9G5 nicht mit diesen myeloischen Vorläuferzellen reagiert. Der Verlust hämopoetischer Vorläuferzellen war sogar geringer, als der Verlust mononukleärer Zellen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von J. Mysliwietz et al. (1987) überein, der in der indirekten Immunoperoxidase-Färbung keine Reaktivität des MoAk 9G5 mit myeloischen oder erythropoetischen Vorläuferzellen fand. Im Knochenmark erwachsener Hunde reagierte der MoAk 9G5 mit bis zu 55% der mononukleären Zellen in der Immunfluoreszenz. Der T-Zell-Gehalt der Knochenmarks einschließlich Blutbeimengung ist jedoch wesentlich geringer. Diese Differenz kann technisch bedingt sein, da der Antikörper für die Immunfluoreszenz längere Zeit tiefgefroren aufbewahrt und nicht anschließend ultrazentrifugiert wurde, so daß inzwischen gebildete Antikörper-Aggregate über FC-Rezeptoren eine Markierung von Nicht-T-Zellen bewirken konnten. Eine Reaktivität mit Vorläuferzellen ist aber nicht auszuschliessen, da der MoAk 9G5 auch wenig differenzierte T-Zellen in der Thymusrinde erkennt. Die aus dem Knochenmark stammenden, noch relativ undifferenzierten T-Vorläuferzellen siedeln sich zunächst in der Thymusrinde an und wandern im Verlauf der Differenzierung ins Thymusmark. Das von MoAk 9G5 erkannte Antigen ist in Thymusrinde und -mark in hoher Konzentration vorhanden (Mysliwietz et al. 1987). Es ist anzunehmen, daß das Antigen schon relativ früh von wenig differenzierten T-Zellen exprimiert wird und im Verlauf der Differenzierung bis zum peripheren Blutlymphozyten erhalten bleibt. Die Mehrzahl der Knochenmarkzellen zeigte im Gegensatz zu Blutzellen eine relativ schwache, punktförmige Fluoreszenz. Ein Teil dieser schwach markierten Zellen bildete keine Rosetten

mit SPA-SRBC. In der Rosettenseparation werden jedoch nur die tatsächlich Rosetten-bildenden Zellen eliminiert. Es stellte sich nun die Frage, ob es sich bei diesen schwach markierten Zellen tatsächlich um T-Vorläuferzellen handelte und ob diese postulierten Vorläuferzellen in der Lage waren, beim Empfänger eines depletierten Transplantates Graft-versus-Host Krankheit hervorzurufen.
Bei Ratten konnte die GvH-Krankheit nur durch Antiseren verhindert werden, die nicht nur reife T-Zellen erkannten und bei denen eine Reaktivität mit T-Vorläuferzellen angenommen wurde (Müller-Ruchholz et al. 1980). Auch andere Autoren fanden Hinweise auf die Beteiligung von T-Vorläuferzellen an der GvH-Entwicklung. O´Kunewick et al. (1981) konnten durch die Transplantation von Milzzellen athymischer Mäuse in bestrahlten Empfängertieren eine Krankheit hervorrufen, die in allen Symptomen der GvH-Krankheit glich und bei 70% der Empfängertiere zum Tode führte. Wulff et al. (1981) wiesen alloreaktive Nicht-T-Zellen im menschlichen Knochenmark nach und postulierten eine T-Vorläuferpopulation, die ohne Ausreifung im Thymus zu allogen stimulierbaren T-Zellen differenzierte.

Nach autologer Transplantation depletierten Knochenmarks erholte sich der Empfänger N 875 rasch, der Empfänger N 865, der eine sehr geringe Gesamtzellzahl erhalten hatte, verzögert. Beide Hunde zeigen ein Jahr nach Transplantation keinerlei Krankheitszeichen. Die Zahl peripherer T-Lymphozyten ist jedoch bei beiden Hunden noch deutlich vermindert. Durch die Depletion determinierter T-Vorläuferzellen, nicht jedoch Stammzellen, könnte eine solche verzögerte T-Zell-Regeneration erklärt werden. Eine bleibende Schädigung der hämopoetischen T-Vorläuferzellen wurde auch von anderen Autoren nicht ausgeschlossen. Irlél et al. wiesen noch 10 Monate nach Transplantation eine deutlich verminderte T-Zell-Reaktivität in Empfängern depletierter Transplantate nach. Auch Hervé et al. beschrieben 1985 eine Immundefizienz nach Transplantation

T-Zell-depletierten Knochenmarks.
Zwei der allogen transplantierten Hunde stießen nach anfänglichem Anstieg der Blutleukozyten das Transplantat ab. Beim Menschen war die geringere Mortalität durch akute GvH-Erkrankungen ebenfalls mit einer vermehrten Transplantat-Abstoßung verbunden (Hale et al. 1987, Waldmann et al. 1984). Für die erhöhte Abstoßungsrate werden residuelle, strahlenresistente Empfänger-T-Zellen verantwortlich gemacht. Reisner et al. konnten 1986 allogen stimulierbare, durch die übliche Empfänger-Konditionierung nicht eliminierbare T-Zellen in Rhesus-Affen nachweisen. Bunjes et al. (1987) sahen eine Population aktivierter Empfänger-T-Zellen in Patienten, die HLA-identisches Knochenmark erhalten hatten zum Zeitpunkt der Abstoßung. Auch O´Reilly et al. (1985) identifizierten eine Host-versus-Graft Aktivität als Ursache der Tranplantat-Abstoßung. Zur Prophylaxe dieser Host-versus-Graft Reaktion ist eine stärker immunsuppressive Vorbehandlung des Empfängers denkbar.
Bozdech et al. konnten 1985 durch eine stärkere cytostatische Vorbehandlung des Empfängers die vermehrte Abstossung verhindern.
Die beiden anderen allogen transplantierten Hunde erkrankten kurz nach Transplantation an akuter GvH-Krankheit und starben innerhalb weniger Wochen. Dies stand in keinem eindeutigen Zusammenhang mit der Zahl der transplantierten residuellen T-Zellen. T-Vorläuferzellen, die von MoAk 9G5 nur zum Teil erkannt wurden und nicht rosettierten konnten hier beteiligt sein.

Eine T-Zell-Depletion kann niemals vollständig sein, so daß auch in T-Zell-depletierten Transplantaten ein geringer Anteil residueller T-Zellen erhalten bleibt. Ist dieser T-Zell-Gehalt zu gering, kann das Transplantat abgestoßen werden, diese T-Zellen können jedoch auch eine Graft-versus-Host Krankheit hervorrufen. Durch die Tranplantation T-Zell-depletierten Knochenmarks bei Hunden konnte bislang kein optimaler T-Zell-Gehalt des Transplan-

tates definiert werden.
Im Tiermodell könnte nun überprüft werden, ob ein noch weitergehend oder völlig T-Zell-depletiertes Transplantat stets abgestoßen wird und nicht in der Lage ist, eine GvH-Krankheit zu verursachen und in welcher Weise die Empfängerkonditionierung verändert werden kann,um diese Abstossung zu verhindern. Weiterhin bleibt zu klären, welche Nicht-T-Zellen, z. B. T-Vorläuferzellen oder Natürliche Killerzellen an der GvH-Reaktion beteiligt sind.

Zusammenfassung

Durch Rosettierung mit dem polyklonalen Antiserum ATG 1202 bzw. dem monoklonalen Antikörper 9G5 und Separation dieser Rosetten über einen Dichtegradienten (Percoll) wurde versucht, reife T-Zellen aus dem Knochenmark erwachsener Hunde zu entfernen. ATG 1202 und MoAk 9G5 wurden in Rosettierung und Immunfluoreszenz mit Zellsuspensionen aus Organen neugeborener Welpen und mit Nylon-Wolle-separierten Blutbzw. Knochenmarkzellen charakterisiert. Durch autologe und allogene Transplantationen wurde untersucht, wie diese Depletion das Anwachsen von Knochenmarktransplantaten und die Graft-versus-Host Krankheit beeinflußt. Die wesentlichsten Ergebnisse sind wie folgt zusammengefaßt:

1. Dieselben T-Zellantigene wurden von ATG 1202 und dem monoklonalen Antikörper 9G5 erkannt.
2. Das polyklonale Antithymozytenglobulin ATG 1202 enthält auch Antikörper, die mit anderen Antigenen und mit anderen Zellen, z. B. CFU_{GM}, reagieren oder kreuzreagieren.
3. Eine T-Zelldepletion von Knochenmarktransplantaten mittels Rosettenseparation mit ATG 1202 war nicht möglich.
4. Der monoklonale Antikörper 9G5 reagierte nicht mit CFU_{GM}.
5. Mit dem monoklonalen Antikörper 9G5 konnten T-Zellen durch Rosettenseparation aus Knochenmarktransplantaten entfernt werden.
6. Die Entfernung von durchschnittlich 99,8% der T-Zellen aus dem Knochenmark mit dem monoklonalen Antikörper 9G5 störte in der Hälfte der Fälle das Anwachsen selbst des DLA-kompatiblen Transplantates, ohne in der anderen Hälfte schwere Graft-versus-Host Krankheit verhindern zu können.

Summary

Characterization of canine T-lymphocytes in bone marrow and separation by rosetting with polyclonal antithymocyte globulin (ATG) and monoclonal pan-T-antibody for prophylaxis of graft-versus-host disease in the dog.

The polyclonal antithymocyte globulin ATG 1202 and monoclonal antibody 9G5 were used for rosetting and separation of mature T-cells in bone marrow by density gradient centrifugation with Percoll. Specific labeling of canine T-lymphocytes by ATG 1202 and MoAk 9G5 was demonstrated by rosetting and immunofluoreszenz staining in puppy lymphoid organ suspensions and nylon-wool separated peripheral peripheral blood and bone marrow cells. The effect of T-cell depletion on engraftment and graft-versus-host disease was investigated by autologous and allogeneic bone marrow transplantations.
The essential results are summarized as follows:

1. ATG 1202 and monoclonal antibody 9G5 recognize the same antigen on T-cells.
2. Antibodies in polyclonal antithymocyte globulin ATG 1202 react and cross-react with further T-cell antigens and with non-T-cells such as CFU_{GM}.
3. T-cell depletion of bone marrow transplants by rosetting with ATG 1202 and density gradient centrifugation was not possible.
4. The monoclonal antibody 9G5 did not react with CFU_{GM}.
5. T-cells of bone marrow transplants could be depleted by rosetting with monoclonal antibody 9G5 and density gradient centrifugation.
6. Depletion of on average 99,8% of T-cells from the bone marrow using monoclonal antibody 9G5 interfered with sustained engraftment of DLA-compatible bone marrow transplants in half of the cases.
   On the other hand severe graft-versus-host disease could not be prevented.

LITERATUR

Aizawa S, Sado T, Kamisaku H, Kubo E (1980)
Cellular basis of the immunohematologic defects observed in short-term semiallogeneic B6C3F1-C3H chimeras: evidence for host-versus-graft reaction initiated by radioresistant T cells.
Cellular Immunology 56 : 47

Alejandro R, Shienvold FL, Latif Z, Esquenazi V, Miller J, Mintz DH (1984)
Monoclonal antibodies recognizing canine and human Ia-like antigens.
Transpl. 38 : 542

Anderson NF, Delorme EJ, Woodruf MF (1960)
Induction of runt disease in rats by injection of thoracic duct lymphocytes at birth.
Transpl. Bull. 7 : 73

Apperley JF, Jones L, Hale G, Waldmann H, Hows J, Rombos Y, Tsatalas C, Marcus RE, Goolden AWG, Gordon-Smith EC, Catovsky D, Galton DAG, Goldman JM (1986)
Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leucaemic relapse.
Bone Marrow Transpl. 1 : 53

Barnes DWH, Loutit JF (1954)
What is the recovery factor of spleen?
Nucleon 12 : 68

Barnes DHW, Loutit JF, Neal FE (1956)
Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow.
Brit. Med. J. 52 : 626

Barnes DWH and J. F. Loutit (1955)
Spleen protection: The cellular hypothesis.
Radiobiology Symposium, Liège, 1954
Z. M. Bacq, ed., Butterworths, London, 1954 : 134

Bevan MJ (1975)
The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T-cells directed against minor histocompatibility antigens.
J. of Exp. Med. 142 : 1349

Billingham RE, Brent L (1959)
Quantitative studies on tissue transplantation immunity IV. Induction of tolerance in newvorn mice and studies on the phenomenon of runt disease.
Phil. Transact. Roy. Soc. (London) 242 : 439

Billingham RE, Brent L, Medawar PB (1953)
Actively acquired tolerance of grafted cells.
Nature 239 : 603

Billingham R, Brent L, Medawar P (1953)
Actively acquired tolerance of foreign cells.
Nature (London) 172 :603

Blazar BR, Quinones RR, Heinitz KJ, Sevenich EA, Filipovich AH (1985)
Comparison of three techniques for the ex vivo elimination of T-cells from human bone marrow.
Exp. Hematol. 13 : 123

Bortin et al. (1987)
Acute graft-versus-host disease following bone marrow transplantation in humans: prognostic factors.
Transpl. Proc. XIX : 2655

Bozdech MJ, Söndel PM, Trigg ME (1985)
Transplantation of HLA-haploidentical T-cell-depleted marrow for leukemia: addition of cytosine arabinoside to the pretransplant conditioning prevents rejection.
Exp. Hematol. 13 : 1201

Bunjes D, Heit W, Arnold R, Schmeiser T, Wiesneth M, Carbonell FL, Porzsolt F, Raghavachar A, Heimpel H (1987)
Evidence for the involvement of host-derived OKT8-positive T cells in the rejection of T-depleted, HLA-identical bone marrow grafts.
Transpl. 43 (4) : 501

Cock AG, Simonsen M (1958)
Immunological attack on newborn chickens by injected adult cells.
Immunology 1 : 103

Coombs RRA, Wilson AB (1981)
Rosette forming reactions
in Clinical Aspects of Immunology, eds Lachmann PJ and Peter SH, 4. Aufl., Oxford: Blackwell Scientific Publications 1981 : 343

Deeg HJ, Wulff JC, DeRose S, Sale GE, Braun M, Brown MA, Springmeyer SC, Martin PJ, Storb R (1982)
Unusual distribution of Ia-like antigens on canine lymphocytes.
Immunogenetics 16 : 445

de Vries, L. M. van Putten, H. Balner, D. W. van Bekkum (1964)
Lésions suggérant une réactivité autoimmune chez des souris atteintes de la "Runt disease" après thymectomie néonatale.
Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. 9 : 381

de Witte T, Hoogenhout J, de Pauw B, Holdrinet R, Janssen J, Wessels J, van Daal W, Hustinx T, Haanen C (1986)
Depletion of donor lymphocytes by counterflow centrifugation successfully prevents acute graft-versus-host disease in matched allogeneic marrow transplantation.
Blood 67 : 1302

de Witte T, Raymakers R, Plas A, Koekman E, Wessels H, Haanen C (1984)
Bone marrow repopulation capacity after transplantation of lymphocyte depleted allogeneic bone marrow using counterflow centrifugation.
Transpl. 37 : 151

Dicke KA, van Bekkum DW (1971)
Allogeneic bone marrow transplantation after elimination of immunocompetent cells by means of density gradient centrifugation.
Transpl. Proc. III : 666

Dicke KA, van Bekkum DW (1970)
Avoidance of acute secondary disease by purification of homopoietic stem cells with density gradient centrifugation.
Exp. Hematol. 20 : 126

Dicke KA, van Hooft JIM, van Bekkum DW (1968)
The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures.
Transpl. 6 : 562

Ferrara J, Lipton J, Hellman S, Burakoff S, Mauch P (1986)
Engraftment following T-cell depleted marrow transplantation.
Transpl. 43 : 461

Filipovich AH, Vallera DA, Youle RJ, Neville DM Jr., Kersey JH (1985)
Ex vivo T cell depletion with immunotoxins in allogeneic bone marrow transplantation: the pilot clinical study for prevention of graft-versus-host disease.
Transpl. Proc. XVII : 442

Filipovich AH, Vallera DA, Youle RJ, Quinones RR, Neville DM jr, Kersey JH (1984)
Ex-vivo treatment of donor bone marrow with anti-T-cell immunotoxins for prevention of graft-versus-host disease.
The Lancet 3 : 469

Fischer A, Durandy A, De Villartay JP, Vilmer E, Gerota I, Griscelli C (1985)
HLA-haploidentical bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency using E-rosette fractionation and cyclosporine.
Transpl. Proc. XVII : 447

Fischer, A, Durandy A, Villartay JP, Vilmer E, Le Deist F, Gerota I, Griscelli C (1986)
HLA-haploidentical bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency using E rosette fractionation and cyclosporine
Blood 67 : 444

Fitchen JH, Ferrone S, Quaranta V (1980)
Monoclonal antibodies to HLA-A, B and Ia-like antigens inhibit colony formation by human bone marrow granulocyte-macrophage forming progenitor cells.
J. Immunol. 125 : 2004

Gerhartz HH, Nothdurft W, Carbonell F, Fliedner TM (1985)
Allogeneic transplantation of blood stem cells concentrated by density gradients.
Exp. Hematol. 13 : 136

Gleichmann E, Gleichmann H (1976)
Graft-versus-host reaction: a pathogenetic principle for the development of drug allergy autoimmunity and malignant lymphoma in non-chimeric individuals. Hypothesis.
Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. 85 : 91

Gorer PA (1937)
The genetic and antigenic basis of tumor transplantation.
J. Pathol. 44 : 691

Goulmy E, Termijtelen A, Bradley BA, van Rood JJ (1977)
Y-antigen killing by T cells of women is restricted by HLA.
Nature 266 : 544

Gowans JL (1962)
The fate of parental strain small lymphocytes in F1 hybrid rats.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 99 : 432

Granger S, Janossy G et al. (1982)
Elimination of T-lymphocytes from human bone marrow with monoclonal T-antibodies and cytotoxic complement.
Brit. J. Haematol. 50 : 367

Graw RG, Herzig GP, Rogentine GN, Yankee RA, Leventhal BG, Whang-Peng J, Halterman RE, Krüger G, Berard C, Henderson ES (1970)
Graft-versus-host reaction complicating HLA-matched bone marrow transplantation.
The Lancet 2 : 1053

Hale G, Bright S, Chumbley G, Hoang T, Metcalf D, Munro AJ, Waldmann H (1983)
Removal of T-cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement.
Blood 63 : 873

Hale G, Cobbold SP, Waldmann H (1987)
T cell depletion with Campath-1 in allogeneic bone marrow transplantation.
mündliche Mitteilung

Heinecke H. (1903)
Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf Tiere.
Münch. Med. Wschr. 48 : 2090

Hervé P, Cahn JY, Flesch M, Plouvier E, Racadot E, Noir A, Couteret Y, Goldstein G, Bernard A, Lenys R, Bresson JL, Leconte des Floris R, Peters A (1987)
Successful graft-versus-host disease prevention without graft failure in 32 HLA-identical allogeneic bone marrow transplantations with marrow depleted of T-cells by monoclonal antibodies and complement.
Blood 69 : 388

Hervé P, Flesch M, Cahn JY, Racadot E, Plouvier E, Lamy B, Rozenbaum A, Noir A, Leconte Des Floris R, Peters A (1985)
Removal of marrow T cells with OKT3-OKT11 monoclonal antibodies and complement to prevent acute graft-versus-host disease.
Transpl. 39 : 138

Hildemann WH, Linscott WD, Marlino MJ (1962)
Immunological competence of small lymphocytes in the graft-versus-host reaction in mice.
In: Transplantation, Ciba Foundation Symposium, eds. Wolstenhome GEW, Cameron MPP
J and A Churchill Ltd, London 1962 : 236

Hoffmann-Fezer G, Rodt H, Eulitz M, Thierfelder S (1976)
Immunohostochemical identification of T-and B-lymphocytes delineated by the unlabeled antibody enzyme method. I. Anatomicao distribution of O-positive and Ig-positive cells in lymphoid organs of mice.
J. Immunol. Meth. 13 : 261

Hoffmann-Fezer G, Löhrs U, Rodt H (1981)
Immunohistochemical identification of T and B lymphocytes by the unlabeled antibody enzyme method. III. Topographical and quantitative distribution of T and B cells in human palatine tonsills.
Cell Tissue Res. 216 : 361

Holler E, Kolb HJ, Bodenberger U, Eckstein R, Hoffmann-Fezer G, Linke RP, Menpel W, Rodt H, Thierfelder S (1984)
Serological identification and separation of canine lymphocyte subpopulations.
Exp. Hematol. 12 : 774

Irlél C, Chapuis B, Marin P, Jeannet M (1986)
Recovery of T-cells and LAK cells after transplantation with Campath-1 + complement treated HLA-identical bone marrow.
Bone Marrow Transpl. 1 : 139

Klein J, Park JM (1973)
Graft-versus-host reaction across different regions of the H-2 complex of the mouse.
J. Exp. Med. 137 : 1213

Körbling M, Fliedner M, Calvo W, Ross WM, Nothdurft W, Steinbach I (1979)
Albumin density gradient purification of canine hemopoietic blood stem cells (HBSC): long-term allogeneic engraftment without GVH-reaction.
Exp. Hematol. 7 : 277

Kolb HJ, Bodenberger U, Rodt HV, Rieder I, Netzel B, Grosse-Wilde H, Scholz S, Thierfelder S (1980)
Bone marrow transplantation in DLA-haploidentical canine littermates. Fractionated total body irradiation (FTBI) and in vitro treatment of the marrow graft with anti-T-cell globulin (ATCG).
in Immunobiology of Bone Marrow Transplantation, eds S. Thierfelder, H Rodt and H.J. Kolb, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1980 : 61

Kolb HJ, Rieder J, Rodt H, Netzel B, Grosse-Wilde H, Scholz S, Schäffer E, Kolb H and Thierfelder S (1979)
Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft-versus-host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin.
Transpl. 27 : 242

Korngold R, Sprent J (1978)
Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing T-cells from marrow.
J. Exp. Med. 148 : 1687

Korngold R, Sprent J (1982)
Features of T cells causing H-2-restricted lethsl graft-vs.-host disease across minor histocompatibility barriers.
J. Exp. Med. 155 : 872

Korngold R, Sprent J (1983)
Lethal GvHD across minor histocompatibility barriers: Nature of the effector cells and role of the H-2 complex
Immunol. Review 71 : 5

Krawiec DR, Muscoplat CC (1984)
Development and characterization of a hybridoma-derived antibody (Aby 1A1) with specificity to canine thymocytes and peripheral T lymphocytes.
Am. J. Vet. Res. 45 : 491

Krawiec DR, Muscoplat CC (1984)
Development and characterization of a monoclonal antibody (Aby 6C6) that distinguishes medullary from cortical thymocytes.
Am J. Ver. Res. 45 : 499

Levitt L, Kipps TJ, Engleman EG, Greenberg PL (1985)
Human bone marrow and peripheral blood T-lymphocyte depletion: efficacy and effect of both T-cells and monocytes on growth of hematopoietic progenitors.
Blood 65 : 663

Lorenz E, Uphoff DE, Shelton E, Ried T (1951)
Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection.
J. Nat. Cancer Inst. 12 : 197

Matzinger (1981)
A one-receptor view of T-cell behaviour.
Nature 292 : 497

McCarthy SA, Francescutti LH, Gambel P et al. (1985)
Identification of host lymphoid cells in antibody-facilitated bone marrow chimeras.
Transpl. Proc. XVII : 510

McKenzie JL, Fabre JW (1981)
Studies with a monoclonal antibody on the distribution of thy-1 in the lymphoid and extracellular connective tissues of the dog.
Transpl. 31 : 275

Miller JFAP, Marshall HE, White RG (1962)
Immunological significance of the thymus.
Adv. Immunol. 2 : 111

Morgan G, Linch DC, Knott LT et al. (1986)
Successful haploidentical mismatched bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency: T cell removal using Campath-1 monoclonal antibody and E-rosetting.
Brit. J. Haematol. 62 : 421

Müller-Ruchholtz W, Wottge HU, Müller-Hermelink HK (1980)
Restitution potentials of allogeneically or xenogeneically grafted lymphocyte free hemopoietic stem cells.
In: Thierfelder S, Rodt H, Kolb HJ eds, Immunobiology of bone marrow transplantation. Berlin Heidelberg New York; Springer 1980 : 153

Murphy JB (1916)
The effect of adult chicken organ graft on the chick embryo.
J. Exp. Med. 24 : 1

Muto M, Sado T, Aizawa S, Kamisaku H, Kubo E (1981)
Bone marrow transplantation across the major histocompatibility barrier in specific-pathogen-free mice: effects of intact versus T cell-depleted bone marrow on the expression of anti-host reaction in the recipient spleens
J. Immunol. 127 : 2421

Mysliwietz JJ, Thierfelder S, Hoffmann-Fezer G, Kolb HJ, Maldacker J
Monoclonal anti-canine T cell antibodies for bone marrow transplantation. Four antibodies recognize two epitopes of a 115/160 kD antigen present on T cells but absent from hemopoietic progenitors.
im Druck

Noga SJ, Donnenberg AD, Schwartz CL, Strauss LC, Civin CI, Santos GW (1986)
Development of a simplified counterflow centrifugation elutriation procedure for depletion of lymphocytes from human bone marrow.
Transpl. 41 : 220

Nowell PC, Cole LJ (1959)
Pathologic changes in old nonirradiated F1 hybrid mice injected with parental-strain spleen cells.
Transpl. Bull. 6 : 435

Nowell PC, Cole LJ, Habermeyer JG, Roan PL (1956)
Growth and continued function of rat marrow cells in X-irradiated mice.
Cancer Res. 16 : 258

O´Kunewick JP, Meredith RF, Raikow RB, Brozovich BJ, Magliere K (1981)
Fatal response suggestive of graft-versus-host reaction following transplantation of spleen cells from allogeneic athymic (nude) donors.
Transpl. 31 : 201

O´Reilly RJ, Collins NH, Kernan N et al. (985)
Transplantation of marrow depleted by soybean lectin and E-rosette depletion: major histcompatibility complex related graft resistance in leucaemic transplant recipients.
Transpl. Proc. XVIII (1) : 455

O´Reilly RJ, Collins NH, Kernan N, Brochstein J, Dinsmore R, Kirkpatrick D, Siena S, Keever C, Jordan B, Shank B, Wolf L, Dupont B, Reisner Y (1985)
Transplantation of marrow-depleted T cells by soybean lectin agglutination and E-rosette depletion: major histocompatibility complex-related graft resistance in leukemic transplant recipients.
Transpl. Proc. XVII : 455

O'Reilly R. J., Kapoor N., Kirkpatrick D. et al. (1982)
Transplantation of histoimcompatible soybean lectin (SBA) separated, E-rosette depleted marrow for severe combined immunodeficiency (SCID) and leukemia: early results in high risk patients.
Blood 60 : 171

Owens AH, Santos GW (1968)
The induction of graft-versus-host disease in mice treated with cyclophosphamide.
J. Exp. Med. 128 : 277

Prendergast MM, Bradstock KF, Broomhead AF, Hughes WG, Kabral A, Berndt MC, Tiver K (1986)
Monoclonal antibody analysis of canine hemopoietic cells. Role of Ia-like and thy-1 antigens in bone marrow engraftment.
Transpl. 41 : 565

Prentice HG (1982)
OKT3 incubation of donor marrow for prophylaxis of acute graft-vs.-host disease (GvHD) in allogeneic bone marrow transplantation.
J. Clin. Immunol. 2 : 148

Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G, Gilmore MJML, Price-Jones L, Tidman N, Trejdosiewicz LK, Skeggs DBL, Panjwani D, Ball S, Graphakos S, Patterson J, Ivory K, Hoffbrand AV (1984)
Depletion of T-lymphocytes in donor marrow prevents significant graft-versus-host disease in matched allogeneic leucaemic marrow transplant recipients.
The Lancet 3 : 472

Reisner Y, Ben-Bassat J, Douer D, Kaploon A, Schwartz E, Ramot B (1986)
Demonstration of clonable alloreactive host T-cells in a primate model for bone marrow transplantation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 4012

Reisner Y, Kapoor N, O'Reilly RJ, Good RA (1980)
Allogeneic bone marrow transplantation using stem cells fractionated by lectins: VI. In vitro analysis of human and monkey bone marrow cells fractionated by sheep red blood cells and soybean agglutinin.
The Lancet 20/27 : 1320

Reisner Y., Kapoor N., Kirkpatrick D. et al. (1981)
Transplantation for acute leukemia with HLA-A and B nonidentical parental marrow cells fractionated with soybean agglutinin and sheep red blood cells.
The Lancet 2 : 327

Richman DD, Cleveland PH, Oxman MN, Johnson KM (1982)
The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species.
J. Immunology 128 : 2300

Rodt H, Kolb HJ, Netzel B, Rieder I, Janka G, Beloradski B, Haas RJ, Thierfelder S (1979)
GVHD suppression by incubation of vone marrow grafts with anti-T-cell globulin: Effect in the canine model and application to clinical bone marrow transplantation.
Transpl. Proc. XI : 962

Rodt H, Netzel B, Niethammer D, Körbling M, Gotze D, Kolb HJ, Thiel E, Haas RJ, Fliedner TM, Thierfelder S (1977)
Specific absorbed antithymocyte globulin for incubation treatment in human marrow transplantation.
Transpl. Proc. IX : 187

Rodt H, Nétzel B, Niethammer D et al. (1977)
Specific absorbed antithymocyte globulin for incubation treatment in human marrow transplantation.
Transpl. Proc. IX : 187

Rodt H, Thierfelder S, Eulitz M (1972)
Suppression of acute secondary disease by heterologous anti-brain serum.
Blut 25 : 385

Rohatiner A, Gelber R, Schlossmann SF, Ritz J (1986)
Depletion of T-cells from human bone marrow using monoclonal antibodies and rabbit complement.
Transplantation 42 : 73

Schuening F, Storb R, Goehle S, Meyer J, Graham T, Deeg HJ, Pesando J (1987)
Canine pluripotent hematopoietic stem cells and CFU_{GM} express Ia-like antigens as recognized by two different class II-specific monoclonal antibodies.
Blood 69 : 165

Shulman HM, Sale GE, Lerner KG, Barker EA, Weiden PL, Sullivan K, Galluci B, Thomas ED, Storb R (1978)
Chronic cutaneous graft-versus-host disease in man
Amer. J. Pathol. 91 : 545

Simonsen M (1957)
The impact on the developing embryo and newborn animal of adult homologous cells.
Acta Path. Microbiol. scand. 40 : 480

Simonsen M (1962)
The factor of immunization. Clonal selection theory investigated by spleen assays of graft-versus-host reactions.
In: Ciba Foundation Symposium on Transplantation.
eds. Wolstenholme, GEW and Cameron, MP,
J. and A. Churchill, Ltd, London 1962 : 185

Simonsen M (1967)
The clonal selection hypothesis evaluated by grafted reacting against their hosts.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32 : 517

Slocombe GW, Newland AC, Yeatman NWJ, Macey M, Jones HM, Knott L (1986)
Allogeneic bone marrow transplantation for adult leukaemia with soy bean lectin fractionated marrow.
Bone Marrow Transpl. 1 : 31

Snell GD (1957)
The genetics of transplantation.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 69 : 555

Storb R, Rudolph RH, Kolb HJ, Graham TC, Mickelson E, Erickson V, Lerner KG, Kolb H, Thomas ED (1973)
Marrow grafts between DLA-matched canine littermates.
Transpl. 15 : 92

Sullivan K, Galluci B, Thomas ED, Storb R (1978)
Chronic cutaneous graft-versus-host disease in man.
Amer. J. Pathol. 91 : 545

Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, Witherspoon RP, McDonald GB, Schubert MM, Atkinson K, Thomas ED (1981)
Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression.
Blood 57 : 267

Szenberg A, Warner NL (1961)
Large lymphocytes and the Simonsen phenomenon.
Nature 191 : 920

Szer J, Deeg J, Rieber P, Storb R
A monoclonal antibody to human cytotoxic/suppressor T lymphocytes cross-reacts with canine lymphocytes and inhibits cell mediated lympholysis of canine cells.
Exp. Hematol. im Druck

Terasaki PJ (1959)
Identification of the type of blood cells responsible for the graft-versus-host reaction in chicks.
J. Embryol. Exp. Morphol. 7 : 394

Thierfelder S, Cobbold S, Kummer U, Waldmann H, Schuh R (1985)
Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VII. Two of nine monoclonal anti-Thy-1 antibodies used for pretreatment of donor marrow suppressed graft-versus-host reactions without added complement.
Exp. Hematol. 13 : 948

Thierfelder S, Kummer U, Schuh R, Mysliwietz J (1986)
Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VIII. Reciplient conditioning with Clq-affine monoclonal anti-pan-T antibodies prevents GvHD in homozygous fully mismatched mice.
Blood 69 : 818

Thierfelder S, Möler D, Kimure P, Dörmer P, Eulitz M, Mempel W (1967)
Die Wirkung von heterologem Antilymphozytenserum auf die homologe und heterologe Knochenmarkübertragung bei supraletal bestrahlten Mäusen.
Blut 15 : 225

Tutschka PJ, Körbling M, Hess AD, Beschorner WE, Santos GW (1981)
Prevention of graft-versus-host disease (GVHD) by chemoseparation of marrow cells.
Transpl. Proc. XIII 1 : 1202

Uphoff DE (1971)
Preclusion of secondary disease of irradiation syndrome by inoculation of fetal hematopoietic tissue following lethal total body irradiation.
J. Nat. Cancer. Inst. 20 : 625

Uphoff DE (1958)
Preclusion of secondary disease of irradiation syndrome by inoculation of fetal hematopoietic tissue following lethal total body irradiation.
J. Nat. Cancer Inst. 20 : 625

Vallera DA, Soderling CCB et al. (1981)
Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. Effect of elimination of T cells from donor grafts by treatment with monoclonal Thy-1,2 plus complement or antibody alone.
Transpl. 31 : 218

Vallera DA, Soderling CCB, Carlson GJ, Kersey JH (1982)
Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. II. T cell requirement for engraftment in total lymphoid irradiation -conditioned recipients.
Transpl. 33 : 243

Vallera DA, Youle RJ, Neville DM, Kersey JH (1982)
Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers. V. Protection of mice from lethal graft-vs.-host disease by pretreatment of donor cells with monoclonal anti-Thy-1.2 coupled to the toxin ricin.
J. Exp. Med. 155 : 949

van Bekkum (1964)
The selective elimination of immunological competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures. I. Effect of storage at 4°C.
Transpl. 2 : 393

van Bekkum DW, de Vries MJ (1967)
in: Radiation Chimeras
Lagos Press, London, Academic Press, New York

van Bekkum (1985)
Graft-Versus-Host Disease.
In Bone Marrow Transplantation Dirk W. van Bekkum and Bob Löwenberg, eds.
Marcel Dekker, Inc., New York 1985 : 147

Vartdal F, Kvalheim G, Lea TE, Bosnes V, Gaudernack G, Ugelstad j, Albrechtsen D (1987)
Depletion of T lymphocytes from human bone marrow. Use of magnetic monosized polymer microspheres coated with T-lymphocyte-specific monoclonal antibodies.
Transpl. 43 : 366

Vos O, Davids JAG, Weyzen WWH, van Bekkum DW (1956)
Evidence for the cellular hypothesis in radiation protection by bone marrow cells.
Acta Physiol. Pharmacol. Nederland. (Amsterdam)
4 : 482

Vos O, de Vries MJ, van Bekkum DW (1959)
Transplantation of homologous and heterologous lymphoid cells in X-irradiated and non-irradiated mice.
J. Nat. Cancer Inst. 23 : 53

Waldmann H, Polliak A, Hale G, Or R, Cividalli G, Weiss L, Weshler Z, Samuel S, Manor D, Brautbar C, Rachmilewitz EA, Slavin S (1984)
Elimination of graft-versus-host disease by in vitro depletion of alloreactive lymphocytes with a monoclonal rat anti-human lymphocyte antibody (Campath-1).
The Lancet 1 : 483

Warner NL, Szernberg A, Burnet FM (1962)
The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsivness.
Austr. J. Exp. Biol. Med. 40 : 73

Wilhelm M, Pechumer H, Rank G, Kopp E, Rierthmüller G, Rieber EP (1986)
Direct monoclonal antibody rosetting. An effective method for weak antigen detection and large scale separation of human mononuclear cells.
J. Immunol. Meth. 90 : 89

Wulff JC, Held H, Müller-Hermelink HK, Schlaak M (1981)
Purification and characterization of human bone marrow lymphocyte subpopulations: evidence for the existence of an alloreactive immature T cell.
Clin. Exp. Immunol. 44 : 485

Wulff JC, Deeg HJ, Storb R (1982)
A monoclonal antibody (DT 2) recognizing canine T lymphocytes.
Transpl. 33 : 616

Wulff JC, Durkopp N, Aprile J, Tsoi MS, Springmeyer SC, Deeg HJ, Storb R (1982)
Two monoclonal antibodies (DLy-1 and DLy-6) directed against canine lymphocytes.
Exp. Hematol. 10 : 609

Yau JC, Chow HS, Kulkarni SS, Huynh LT, Zander AR (1986)
Regeneration of T lymphocytes from human bone marrow cells after depletion with methylprednisolone.
J. Clin. L. Immunol. 19 : 15

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974)
Activity of senditized thymus derived lymhocytes in lymphocytic choriomeningitis reflects immunological surveillance against altered self components.
Nature 251 : 547

Lenbenslauf

24. 02. 59	Geboren in Lauterbach
09/66 - 08/70	Besuch der Grund- und Hauptschule in Lauterbach
09/70 - 08/75	Besuch der Realschule in Schramberg
09/75 - 05/78	Besuch des Wirtschaftsgymnasiums in Hausach
19. 5. 78	Abitur
11/78 - 03/84	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Abschluß Staatsexamen
8. 5. 84	Approbation
01/85 - 12/87	Doktorarbeit im Institut für klinische Hämatologie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München.
09/85 - 12/86	Tätigkeit als studentische bzw. wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Immungenetik, Prof. Albert, München.

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten danke ich Herrn Prof. Dr. K. Tempel, Herrn Prof. Dr. S. Thierfelder und Herrn Prof. Dr. H. J. Kolb.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. J. Kolb, Frau Dr. L. K. Lösslein und Herrn Dr. E. Holler für ihre Unterstützung und den jederzeit gewährten Rat.